

ENTWICKLUNG
VERSCHIEDENER HOCHSPEZIFISCHER
ELISA-NACHWEISSYSTEME FÜR EINEN
PHOSPHORSÄUREESTER
UNTER VERWENDUNG
HAPTENSPEZIFISCHER
MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Michael Erhard

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554816_0089

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

ENTWICKLUNG VERSCHIEDENER HOCHSPEZIFISCHER
ELISA- NACHWEISSYSTEME FÜR EINEN
PHOSPHORSÄUREESTER
UNTER VERWENDUNG HAPTENSPEZIFISCHER
MONOKLONALER ANTIKÖRPER

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. U. Lösch
Korreferent:	Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Druck: Fa. Ganter
Meglingerstr. 14 · 8000 München 71

Meinen Eltern und

Großeltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL und METHODEN	5
2.1. Versuchstiere	5
2.2. Zellmaterial	5
2.3. Reagentien und Chemikalien	5
2.4. Methoden	6
2.4.1. Kopplung eines Phosphorsäureesters (PSE) an verschiedene Proteinträger	6
2.4.2. Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen PSE	7
2.4.2.1. Immunisierung der BALB/c- Mäuse	7
2.4.2.2. Kultivierung der Myelomzellen	7
2.4.2.3. Zellfusion	8
2.4.2.4. Kultivierung der Hybridomzellen	8
2.4.2.5. Screeningtest	9
2.4.2.6. Klonierung	11
2.4.2.7. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -sub- klassen	11
2.4.2.8. Konservierung der positiven Klone	12
2.4.2.9. Produktion von monoklonalen Antikörpern über Ascites	12
2.4.2.10. Isolierung der monoklonalen Antikörper mit Hilfe von Protein- A- Sepharose	13

	Seite
2.4.3. Entwicklung eines indirekten ELISA- Nachweis- systems (Competitive inhibition enzyme immuno- assay = CIEIA) für PSE mit Hilfe der ge- wonnenen monoklonalen Antikörper	14
2.4.3.1. Austestung verschiedener Beschichtungen und Be- schichtungskonzentrationen	14
2.4.3.2. Verwendung unterschiedlicher Konjugatkonzentra- tionen	15
2.4.3.3. Untersuchung unterschiedlicher Substratkonzen- trationen	15
2.4.3.4. Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentra- tion im indirekten ELISA	15
2.4.3.5. Durchführung des CIEIA	16
2.4.4. Untersuchungen über die Affinität und die Spezifität der monoklonalen Antikörper mit Hilfe des indirekten ELISA (2.4.3.4.)- bzw. des CIEIA (2.4.3.5.)-Systems	17
2.4.4.1. Abschätzung der Affinität	17
2.4.4.2. Überprüfung der Spezifität	17
2.4.5. Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA- Systems mit einem an Peroxidase ge- koppelten monoklonalen Antikörper	19
2.4.5.1. Kopplung von Peroxidase an den monoklonalen Antikörper "F7 1 D7"	19
2.4.5.2. Ermittlung der optimalen Antikörper-Peroxidase- konzentration beim Einsatz im indirekten ELISA	20
2.4.5.3. Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA	20

	Seite
2.4.6. Entwicklung eines direkten kompetitiven ELISA- Systems durch Einsatz von an Peroxidase gekoppeltem PSE	21
2.4.6.1. Kopplung von PSE an Peroxidase	21
2.4.6.2. Ermittlung der optimalen PSE-Peroxidasekonzentration für den Einsatz im direkten ELISA	22
2.4.6.3. Durchführung des direkten kompetitiven ELISA- Systems	23
2.4.7. Schematische Darstellung der entwickelten ELISA- Systeme	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1. Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen PSE	25
3.1.1. Zellfusion	
3.1.2. Screeningtest und Klonierung	25
3.1.3. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen	26
3.1.4. Produktion von monoklonalen Antikörpern über Ascites	27
3.1.5. Reinigung der monoklonalen Antikörper aus dem Ascites über Protein- A- Sepharose	29
3.2. Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA- Systems (CIEIA) zum Nachweis von PSE mit Hilfe der gewonnenen monoklonalen Antikörper	32
3.2.1. Optimierung der Versuchsbedingungen	32
3.2.2. Durchführung des CIEIA	37

	Seite
3.3. Untersuchungen über die Affinität und Spezifität der monoklonalen Antikörper	42
3.3.1. Abschätzung der Affinität	42
3.3.2. Überprüfung der Spezifität	43
3.4. Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA mit an Peroxidase gekoppeltem monoklonalen Antikörper	45
3.4.1. Ermittlung der optimalen Antikörper- Peroxidasekonzentration beim Einsatz im indirekten ELISA	45
3.4.2. Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA	47
3.5. Entwicklung eines direkten kompetitiven ELISA-Systems durch Einsatz von an Peroxidase gekoppeltem PSE	50
3.5.1. Kopplung von PSE an Peroxidase	50
3.5.2. Durchführung des direkten kompetitiven ELISA	55
3.6. Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen entwickelten ELISA-Nachweissysteme für PSE	59
4. DISKUSSION	60
5. ZUSAMMENFASSUNG	70
6. SUMMARY	72
7. LITERATURVERZEICHNIS	74

ABKÜRZUNGEN

BSA	bovines Serumalbumin
CIEIA	Competitive inhibition enzyme immunoassay
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund`s complete adjuvant
FCS	Fetal calf serum
HAT	Hypoxanthin/ Aminopterin/ Thymidin
HC	Hämocyanin
HSA	Humanes Serumalbumin
HT	Hypoxanthin/ Aminopterin
IC	Inhibition concentration
Jg	Immunglobulin
LPS	Lipopolysaccharid
MAK	Monoklonaler Antikörper
PEG	Polyethylen Glycol
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PSE	Phosphorsäureester: 1,2,2-Trimethyl-propyl-p-aminophenylphosphonat-hydrochlorid

1. EINLEITUNG

Seit der Synthese des ersten organischen Phosphorsäureesters im Jahre 1854 durch De Clermont wurden bis zum heutigen Zeitpunkt über hundert verschiedene derartige Verbindungen entwickelt. Ihre Bedeutung stieg seit der systematischen Bearbeitung durch G. Schrader im Jahre 1934 stetig. Jährlich werden derzeit über eine Million Tonnen organische Phosphorsäureester produziert, wobei allein im Jahre 1981 zum Beispiel in den USA 32000 Tonnen und in Italien 18000 Tonnen verbraucht wurden (Daunerer et al., 1980; World Health Organisation, 1986).

Chemisch handelt es sich bei dieser Stoffklasse um Ester und Amide der Phosphor-, Phosphon- und Phosphinsäure, die sich meist durch eine hohe akute Toxizität auszeichnen. Ihr Einsatz ist vielseitig wie zum Beispiel als Kontakt- und Systeminsektizide im Pflanzenschutz, zur Malariabekämpfung, als Fungizide und nicht zuletzt gegen Ekto- und Endoparasiten in der Veterinärmedizin. Der Organismus speichert die biologisch abbaubaren organischen Phosphorsäureester im Vergleich zu den vor allem früher als Insektizide verwendeten chlorierten cyclischen Kohlenwasserstoffen wie DDT nicht (Forth et al., 1983).

Insekten besitzen die zur Ethanolabspaltung erforderlichen Esterasen im Gegensatz zu den Warmblütern nicht. Dadurch ist die insektizide Wirkung der organischen Phosphorsäureester bei geringerer Toxizität für den Warmblüter zu erklären. Trotzdem verbleibt bei vielen Verbindungen auch für homoiotherme Tiere eine sehr hohe Toxizität.

Der Wirkungsmechanismus ist als eine "innere Acetylcholinvergiftung" zu beschreiben. Durch die irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase kann das freigesetzte Acetylcholin nicht mehr gespalten werden (Matsumura, 1985).

Bei den Vergiftungssymptomen muß man zwischen muskarin- und nikotinartigen Wirkungen mit den jeweiligen klinischen Er-

scheinungen unterscheiden. Die muskarinartige Wirkung an den Endstrukturen parasymphischer Nerven hängt von der Funktion cholinergter Rezeptoren ab. Die nikotinartigen Symptome sind auf die Hemmung der Cholinesterase an den vegetativen Ganglien und der motorischen Endplatte zurückzuführen.

Als Spätfolgen treten bei Mensch und Huhn durch Demyelinisierung der Nervenscheiden und Axomdegenerationen teilweise irreversible Lähmungserscheinungen auf (Jolly, 1957; Davies, 1963; Willems et al., 1984).

Therapeutisch ist zunächst auf die Aufrechterhaltung der wichtigsten Lebensfunktionen und auf eine Verhinderung weiterer Giftaufnahme zu achten (Kraft, 1984). Spezifisch kann eine Hemmung der Acetylcholinrezeptoren durch Verabreichung von Atropin durchgeführt werden. Die nikotinartige Wirkung ist im Gegensatz zur muskarinartigen durch Atropin nicht zu beeinflussen. Zur Reaktivierung der an Phosphorsäureester gebundenen Cholinesterase kann in schweren Vergiftungsfällen zusätzlich bei frühzeitigem Einsatz die Oxim-Therapie durchgeführt werden. Auch hier wird eine gezielte Diagnose gefordert, da zum Beispiel bei einer Carbamatvergiftung Oxime kontraindiziert sind (Koelle, 1957; Leuzinger und Pasi, 1970; Hauser et al., 1981; Kraft, 1984; Matsumura, 1985; Eyer et al., 1986).

Aufgrund der Bedeutung der Phosphorsäureester sind sowohl in der Prophylaxe als auch in der klinischen Diagnostik schnelle, sichere und möglichst empfindliche Nachweismethoden zu fordern. Indirekt werden die Phosphorsäureester vor allem mit Serum-Cholinesterasetestmethoden bestimmt. Die Hemmung der Cholinesterase kann aber mit diesen Methoden nicht exakt erfaßt werden (Jolly, 1957; Rappaport et al., 1959; Grob, 1963; Silvestri, 1977; Matsumura, 1985).

Der direkte Nachweis der Phosphorsäureester erfolgt mit Hilfe der Gaschromatographie. Diese Methode hat ihre Nachteile in dem finanziellen und zeitlichen Aufwand und dem hohen Anspruch in Bezug auf das Bedienungspersonal (Benshop et al.,

1981; Sass et al., 1982; D` Agostino and Provost, 1986).

Daneben haben sich gerade immunologische Nachweisverfahren zum Nachweis von Haptenen bewährt, die seit der Erfindung des Radioimmunoassays (RIA) und des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zu Beginn der 70er Jahre mehr und mehr an Bedeutung gewonnen haben (Engvall and Perlmann, 1971; Van Weemen and Schuurs, 1971; Rubenstein et al., 1972).

Bezüglich der Spezifität, der Sensitivität, der Reproduzierbarkeit und des zeitlichen und finanziellen Aufwandes können die verschiedenen ELISA- Methoden durchaus mit den RIA-Methoden verglichen werden (Bosch et al., 1978). Neben der Beschaffenheit von Antigen, Antikörper, Enzymaktivität und anderen Parametern beeinflusst auch die jeweilige ELISA-Technik die Resultate (Sullivan et al., 1979).

Man unterscheidet grundsätzlich homogene und heterogene ELISA-Systeme (Clark et al., 1986).

Bei den homogenen Verfahren werden die beteiligten Enzymsysteme durch eine in vitro stattfindende Antigen- Antikörperreaktion in ihrer Aktivität verändert. Dabei korreliert die auftretende Enzymreaktion direkt mit der Menge des Antigens und wird durch eine Farbreaktion über eine chromogene Gruppe sichtbar gemacht (Morris et al., 1981). Bei den heterogenen Systemen sind einzelne Waschschrte notwendig, um die nicht gebundenen Reaktionspartner zu entfernen. Zunächst wurden antigenspezifische Antiseren bzw. isolierte und aufbereitete polyklonale Antikörper zur Durchführung derartiger Tests verwendet.

Seit der Entdeckung von Köhler und Milstein (1975), wonach spezifische monoklonale Antikörper über Hybridomzellen produziert werden können, finden diese einen großen Anwendungsbereich. Neben Erforschung antigener Strukturen und dem Einsatz in der Endokrinologie finden sie vor allem in der klinischen Diagnostik Anwendung. Erste Erfolge wurden bereits in den therapeutischen Bereichen erzielt (Campbell, 1984; Keenan et al., 1985).

Das Prinzip der Herstellung dieser Antikörper beruht darauf, daß die Fähigkeit zum permanenten Wachstum einer Myelomzelle mit der Fähigkeit zur Antikörpersynthese einer Plasmazelle vereint wird:

Gegenüber polyklonalen Antisera besitzen sie den Vorteil stets gleichbleibender Spezifität und Affinität und garantieren somit einen hohen Grad an Reproduzierbarkeit der immunologischen Testverfahren (Ehrlich and Moyle, 1986).

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe monoklonaler Antikörper verschiedene hoch spezifische, empfindliche und leicht durchzuführende ELISA-Systeme zum Nachweis von 1,2,2-Trimethyl-propyl-p-aminophenylphosphonat-hydrochlorid (PSE/Abb.1) als Beispiel eines organischen Phosphorsäureesters zu entwickeln.

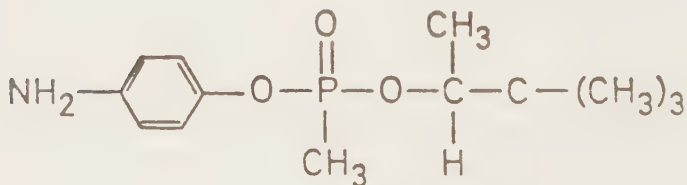


Abb.1: Strukturformel von 1,2,2-Trimethyl-propyl-p-amino-phenylphosphonat-hydrochlorid (PSE)

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 6 bis 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts der Firma Bommice (Bomholtgard, Dänemark), die unter gleichen Bedingungen in Gruppenkäfigen gehalten wurden. Die Standarddiät war handelsübliches Alleinfuttermittel (Altromin^R) in pelletierter Form und Wasser ad libitum.

2.2. Zellmaterial

Für die Zellfusionen wurde die "non-producer"-BALB/c-Mausmyelomzelllinie X 63-Ag 8.653 (Kearney et al., 1979) verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Tierpathologie in München zur Verfügung gestellt.

2.3. Reagentien und Chemikalien

- 1,2,2- Trimethyl-propyl-p-aminophenylphosphonat-hydrochlorid (PSE) / Organisatie voor toegepast natuurwetenschappelijk Onderzoek (TNO), Rijswijk, Niederlande
- Phosphorsäureester: Dichlorvos (DDVP), Malathion, Paraoxon-methyl, Parathion-methyl und Trichlorfon / Fa. Dr. Siegmund Ehrendorfer, Augsburg
- Humanes Serumalbumin (HSA), Bovines Serumalbumin (BSA), Lipopolysaccharid von Salmonella minnesota Re 595 (LPS), Glutaraldehyd, 5-Aminosalicylsäure-Substrat, Natriumperjodat (NaIO_4), Natriumborohydrid (NaBO_4) / Fa. Sigma, St. Louis, USA.
- Hämocyanin (HC), Dimethylsulfoxid (DMSO) und Liver Cell

- Growth Factor (Gly-His-Lys) / Fa. Serva, Heidelberg
- Ziege-anti-Maus IgG und IgM Peroxidasekonjugat, Ziege-anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat und Immunglobulinsubklassenspezifische Ziege-anti-Maus Antisera / Fa. Medac, Hamburg
 - Fetales Kälberserum (FCS), Penicillin/ Streptomycin (P/S), Hypoxanthin/ Aminopterin/ Thymidin (HAT), Hypoxanthin/ Thymidin (HT), RPMI 1640 Medium (ohne Glutamin), PBS-Tabletten / Fa. FLOW, Meckenheim
 - Glutamin / Fa. Biochrom, Berlin
 - Polyethylen Glycol (PEG 1500) und Peroxidase aus Meerrettich / Fa. Boehringer, Mannheim
 - Protein-A-Sepharose CL 4B und Sephadex-G-25 / Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
 - 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan^R) / Fa. Aldrich, Steinheim
 - Freund's Complete Adjuvant (FCA) / Fa. Difco Laboratories, Detroit, USA

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

2.4. Methoden

2.4.1. Kopplung von PSE an verschiedene Proteinträger

PSE wurde über Diazokopplung (Suttnar et al., 1977) an humanes Serumalbumin (HSA), an bovines Serumalbumin (BSA) und Hämocyanin (HC) gebunden.

Mit dieser Methode wird das Hapten über seine primäre Aminogruppe an eine freie Aminogruppe des Carriers gekoppelt.

Die Kopplungsrate wurde nach der Methode von Fenton and Singer (1971) bestimmt.

Folgende Kopplungsprodukte konnten gewonnen werden:

- PSE₁₇- HSA (17 PSE- Moleküle an ein HSA- Molekül gekoppelt)
- PSE₁₈- BSA
- PSE₅₅- HC

2.4.2. Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen PSE

2.4.2.1. Immunisierung der BALB/c- Mäuse

Die Mäuse wurden mit 100 ug PSE- HSA in 0,1 ml phys. NaCl- Lösung zusammen mit 0,1 ml FCA subkutan immunisiert (Halk, 1986).

Nach 8 Wochen erfolgte eine erste Boosterung mit 100 ug PSE- HSA in 0,5 ml phys. NaCl- Lösung intraperitoneal.

Nach weiteren 6 Wochen erhielten die Mäuse an 4 aufeinanderfolgenden Tagen 100 ug PSE- HSA in 0,5 ml phys. NaCl- Lösung intraperitoneal (Stähli et al.,1980), wobei am 1.Tag 25 ug LPS als Mitogen (Andersson et al.,1978) mit verabreicht wurden. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Fusion.

2.4.2.2. Kultivierung der Myelomzellen

Das Myelomzellkulturmedium bestand aus 10 % FCS, 1 % Glutamin 1 % Penicillin/ Streptomycin und 88 % RPMI. Die Zellen wurden in Nunc^R- Zellkulturflaschen aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO₂ im CO₂- Auto- Zero- Brutschrank (Fa.Heraeus) inkubiert. Das Splitting der Zellen erfolgte bei dichtem Bewuchs jeweils nach Bedarf im Verhältnis zwischen 1:2 und 1:40.

2.4.2.3. Zellfusion

Die Hybridisierung von Milzplasmazellen und Myelomzellen erfolgte nach dem von Köhler und Milstein (1975) erarbeiteten Prinzip in einer Modifikation nach Peters et al. (1985). Unter sterilen Bedingungen wurden 7×10^7 Milzzellen in 10 ml Myelomzellkulturmedium aufgenommen und mit 1×10^7 Myelomzellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei $200 \times g$ 5 min zentrifugiert. Nach dem vollständigen Absaugen des Überstands wurden die Zellen in Gegenwart von 1,5 ml 37°C warmem Polyethylen Glycol (PEG 1500, Fa. Boeringer Mannheim) fusioniert. Dabei wurde das PEG innerhalb einer Minute auf das Sediment gegeben und dabei sanft geschüttelt. Nach einer einminütigen Einwirkzeit wurden in den ersten 30 Sekunden ein ml, in den zweiten 30 Sekunden 3 ml und in weiteren 60 Sekunden 16 ml vorgewärmtes PBS (1 Tablette auf 100ml Aqua bidest., Fa. Flow, Meckenheim) zugetropft. Nach sofortiger Zentrifugation bei $500 \times g$ wurde die Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Zellsediment nach dem Absaugen des Überstandes in 40 ml HAT-Selektionsmedium (15 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin, 2 % HAT, 81 % RPMI) aufgenommen.

2.4.2.4. Kultivierung der Hybridomzellen

100 ul der bei dieser Fusion hergestellten Zellsuspension wurden ohne Benützung eines "feeder-layers" jeweils in eine Kavität einer Nunc^R 96-Microwellplatte ausgesät und im Brutschrank inkubiert (siehe oben).

Nach 4 Tagen wurden weitere 100 ul HAT (Hypoxanthin/ Aminopterin/ Thymidin)-Selektionsmedium pro Kavität zugegeben. Bis zum Beginn des Screeningtests wurden jeweils alle 3 - 4 Tage 100 ul verbrauchtes Selektionsmedium durch die

gleiche Menge an frisch zubereitetem Medium ersetzt. Das Zellwachstum wurde ab dem 5. Tag regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Nach 14 Tagen wurde HAT unter Weglassen von Aminopterin durch HT, nach weiteren 14 Tagen vollkommen durch RPMI-Medium ersetzt.

2.4.2.5. Screeningtest

Ab dem 10. Tag nach der Fusion wurden die einzelnen Hybridome im ELISA auf ihre Antikörperproduktion gegen PSE getestet.

Folgende Puffer und Substanzen wurden verwendet:

- Na- Carbonatpuffer (0,1 mol/l; pH 9,6)
- Na- Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 5)
- Na- Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 8)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,2 bzw.
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % Tween 20
(PBS-Tween) pH 7,2
- Substratlösung: 0,08 g 5-Aminosalicylsäure (Fa. Sigma, St. Louis, USA) / 100 ml Aqua bidest. mit 0,005 % H_2O_2 -Lösung
als Sauerstoffdonator

Beschichtung der ELISA-Platten mit PSE-Hämocyanin:

Die ELISA-Platten (Immunoplate II, Fa. Nunc, Wiesbaden) wurden mit 200 μ l PSE-HC (25 μ g/ml) / Kavität 3 Stunden in Carbonatpuffer bei 37°C beschichtet und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach 9-maligem Waschen mit PBS-Tween wurden 100 μ l Kulturüberstand (1:2 mit PBS-Tween vorverdünnt) in jede Kavität pipettiert und 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach weiterem Waschen (s.o.) wurden 50 μ l/Kavität Ziege-anti-Maus IgG- und IgM-Peroxidasekonjugat (Fa. Medac, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-Tween einpipettiert. Nach

einer weiteren 90-minütigen Inkubation und einem letzten Waschschritt wurden 100 µl Substratlösung (0,08 g/100ml) pro Kavität zugegeben. Die Enzymreaktion wurde nach 10 Minuten mit 50 µl 1 mol/l NaOH-Lösung abgestoppt und die Extinktion bei 492 nm im Titertek ELISA-Reader gemessen. Positive Proben zeigten dabei stets eine Extinktion von $> 0,5$, während negative Proben eine Extinktion von $< 0,1$ aufwiesen. Zur Verifikation wurden die positiven Kulturüberstände (90 Minuten bei 37°C) mit 30 µg ungekoppelten PSE/ml PBS-Tween vorinkubiert. Die Hemmung der Antikörperaktivität konnte durch die Abnahme der Extinktion nachgewiesen werden.

Direkte Beschichtung der ELISA-Platten mit freiem PSE:

Die im Test mit PSE-HC positiven Kulturen wurden in einem weiteren ELISA getestet. Dabei wurden die ELISA-Platten wie früher beschrieben (Schmidt et al., 1988) nach einer Methode von Suter (1982) direkt mit Hapten beschichtet, um falsch positive Reaktionen der Antikörper mit kreuzreagierenden Proteindeterminanten oder mit der Diazobindungsstelle (Hunter et al., 1982) zu eliminieren.

Die ELISA-Platten wurden zunächst mit 0,2%iger Glutaraldehydlösung in Phosphatpuffer pH 5 (200 µl/Kavität) 4 Stunden bei Raumtemperatur aktiviert. Nach dem Waschen der ELISA-Platten mit Phosphatpuffer pH 5 (9 Waschzyklen) erfolgte die Beschichtung mit 25 µg PSE/ml Phosphatpuffer pH 8 (200 µl/Kavität) über die Ausbildung einer Schiff'schen Base. Die Platten wurden mit PSE 3 Stunden bei 37°C und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Vor dem Auftragen der Proben wurden noch freie Bindungsstellen mit 200 µl/Kavität 0,1 mol/l Ethanolaminlösung in Phosphatpuffer pH 8 eine Stunde bei 37°C blockiert. Die weitere Durchführung des ELISA erfolgte wie oben beschrieben.

2.4.2.6. Klonierung

Die im Screeningtest positiven Kulturen wurden mit Hilfe der "limiting dilution"-Methode kloniert (Galfre and Milstein, 1981; De Blas et al., 1983). Die Zellsuspension wurde mit Medium so verdünnt, daß rechnerisch 0,4 Zellen pro Kavität einer 96-Mikrowell Zellkulturplatte einpipettiert wurden. 24 Stunden vorher wurde auf diesen Platten ein "feeder layer" aus BALB/c-Milzzellen ($2-4 \times 10^5$ Zellen/Kavität) vorbereitet (Galfre et al., 1977; Levy et al., 1978). Das Zellwachstum wurde in den einzelnen Kavitäten mikroskopisch kontrolliert. Der Fortgang der Klonierung wurde nach der Poisson-Wahrscheinlichkeitsverteilung (Coller and Coller, 1986) ausgewertet. Eine Kultur wurde bei einer Wahrscheinlichkeit von $> 99\%$ als monoklonal bezeichnet, was durch fortlaufende Klonierung positiver Kulturen erreicht werden konnte. Monoklonale Kulturen wurden am 7.Tag zusätzlich auf das Vorhandensein einer Kultur pro Delle mikroskopisch kontrolliert. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden stets im ELISA auf Antikörperaktivität gegen PSE überprüft.

2.4.2.7. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Zur Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen der gebildeten Antikörper wurden die entsprechenden Kulturüberstände konzentriert (Zentrifugation im Centricon 30 Mikrocetrator, Fa. Amicon, Danvers) und die Immunglobulinisotypen mittels Ouchterlony Immunodiffusion (Ouchterlony, 1962) bestimmt. Dabei wurden subtypspezifische Ziege-anti-Maus-Antiseren (Fa. Medac, Hamburg) verwendet.

2.4.2.8. Konservierung der positiven Klone

Zur Konservierung wurden die positiven Zellklone (Wells and Bibb, 1986) in der logarithmischen Wachstumsphase in Portionen zu 5×10^6 Zellen/ml im Einfriermedium (20 % FCS, 10 % DMSO, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin, 68 % RPMI) zunächst bei -79°C (Ashwood-Smith, 1961) und nach 24 Stunden in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die aufgetauten Zellen wurden nach dem Ausverdünnen des DMSO mit Medium auf einer mit "feeder layer" vorbereiteten 24-Wellen-Zellkulturplatte (Nunc^R, Fa. Nunc) ausgesät (ca. 10^6 Zellen/Delle) und weiter wie oben beschrieben kultiviert.

2.4.2.9. Produktion von monoklonalen Antikörpern über Ascites

Erwachsenen BALB/c-Mäusen wurden 0,2 ml 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan (Pristan^R, Fa. Aldrich, Steinheim) intraperitoneal appliziert (Hoogenraad and Wraight, 1986).

10 Tage später erhielten die Mäuse 5×10^6 Hybridomzellen in 0,5 ml Medium i.p. injiziert (Brodeur et al., 1984). Sobald Fluktuation tastbar war (im allgemeinen 10 Tage nach der Zellapplikation) wurde der Ascites durch Punktion der Bauchhöhle gewonnen. Der Ascites wurde abschließend 10 Minuten bei $400 \times g$ zentrifugiert und der Überstand bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.4.2.10. Isolierung der monoklonalen Antikörper mit Hilfe von Protein-A-Sepharose

Die Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose (Kronvall et al., 1970; Ey et al., 1978; Chalon et al., 1979; Seppälä et al., 1981) nach Empfehlung des Herstellers (Pharmacia, 1986) aus der Ascitesflüssigkeit isoliert.

Das Prinzip beruht auf der spezifischen Bindung von Protein A aus *Staphylococcus aureus* an die Fc-Fragmente von Immunglobulin G (Forsgreen and Sjoquist, 1966).

Folgende Puffer wurden verwendet:

- Bindungspuffer (1,5 mol/l Glycin, 3 mol/l NaCl, mit 5 mol/l NaOH auf pH 8,9 eingestellt)
- Elutionspuffer (100 mmol/l Zitronensäure, mit 5 mol/l NaOH auf pH 6,0 bzw. 5,0 eingestellt)
- Regenerationspuffer (100 mmol/l Zitronensäure, mit 5 mol/l NaOH auf pH 3,0 eingestellt)

Die 1 : 2 mit Bindungspuffer verdünnte Ascitesprobe wurde bei 30000 x g für 30 Minuten bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und dann mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/h aufgetragen (0,5 ml Ascites/ ml Protein-A-Sepharosegel). Es wurde so lange mit Bindungspuffer nachgewaschen (0,2 ml/min) bis die Extinktion bei 280 nm < 0,01 betrug (ca. 20 Säulenvolumina).

IgG₁ wurde mit Elutionspuffer pH 6, IgG_{2a} mit Elutionspuffer pH 5 eluiert (0,1 ml/min).

Mit Regenerationspuffer wurde bis zu einer Extinktion < 0,01 (280 nm) nachgewaschen.

Die Protein-A-Sepharose wurde bis zur weiteren Verwendung in Bindungspuffer mit 0,02 % Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

Die proteinhaltigen Eluatfraktionen wurden vereinigt und ge-

gen PBS (pH 8) dialysiert.

Die Proteinbestimmung des Eluatpools erfolgte nach Bradford (1976) mit bovinem Gammaglobulin als Referenzsubstanz.

Die Ausbeute der Protein-A-Sepharose-Reinigung wurde im ELISA (siehe 2.4.2.5.) ermittelt.

Die Reinheit des IgG Eluats wurde mit der Polyacrylamidgелеlektrophorese überprüft (Laemmli, 1970)

2.4.3. Entwicklung eines indirekten ELISA- Nachweissystems (Competitive inhibition enzyme immunoassay = CIEIA) für PSE mit Hilfe der gewonnenen monoklonalen Antikörper

Zur Optimierung des im Screeningtest verwendeten ELISA-Systems wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Die verwendeten Pufferlösungen, Inkubationszeiten und Pipettiervolumina entsprechen dem unter 2.4.2.5. beschriebenen System.

2.4.3.1. Austestung verschiedener Beschichtungen und Beschichtungskonzentrationen

Als Beschichtung wurde PSE- HSA, PSE- BSA, PSE- HC und freies PSE in einer Konzentration von 30 μg / ml Beschichtungspuffer getestet. Das Ziege- anti- Maus-IgG Peroxidaseantikörperkonjugat wurde dabei in einer Verdünnung von 1 : 500 und das N- Salicylsäuresubstrat in einer Konzentration von 0,16 g / 100 ml Aqua bidest. verwendet.

Daraufhin wurden Konzentrationen von 10 - 1 μg PSE- BSA / ml Beschichtungspuffer im gleichen System ausgetestet.

2.4.3.2. Verwendung unterschiedlicher Konjugatkonzentrationen

Bei der Austestung verschiedener Konjugatkonzentrationen von 1:500 bis 1:5000 wurde eine Beschichtungskonzentration von 30 µg PSE- BSA / ml Beschichtungspuffer und eine Substratkonzentration von 0,16 g N- Salicylsäure / 100 ml Aqua bidest. verwendet.

2.4.3.3. Untersuchung unterschiedlicher Substratkonzentrationen

Die Konzentration von 0,16 g N- Salicylsäure / 100 ml Aqua bidest. wurde mit der im Screeningtest verwendeten Konzentration von 0,08 g / 100 ml Aqua bidest. verglichen. Die Beschichtungskonzentration betrug 30 µg PSE- BSA / ml Beschichtungspuffer und die Konjugatverdünnung 1 : 500.

2.4.3.4. Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration im indirekten ELISA

Nach Beschichtung der ELISA-Platten mit 30 µg/ml PSE-BSA und Waschen mit PBS-Tween wurden $\log_2$ -Verdünnungen der monoklonalen anti-PSE-Antikörper (10 µg/ml- 305 pg/ml) einpipettiert (50 µl/Kavität). Nach 90minütiger Inkubation bei 37°C und weiterem Waschen wurden 50 µl/Kavität einer 1 : 500 Verdünnung des Ziege-anti-Maus-IgG Peroxidasekonjugats (Fa Medac, Hamburg) in PBS-Tween aufgetragen. Nach einer weiteren 90minütigen Inkubation bei 37°C und einem letzten Waschgang wurden 100 µl/Kavität Substratlösung (0,16 g/100 ml 5-Aminosalicylsäure mit 0,005% H_2O_2 als Sauerstoffdonator) zugegeben und nach 10 Minuten die Enzymreaktion mit 50 µl 1N NaOH-Lösung gestoppt. Die Extinktion wurde bei 492 nm gemessen. Als optimal wurden diejenigen Antikörperkonzentrationen erachtet, bei denen die Titrationskurve einen linearen Verlauf bei hoher Extinktion zeigte.

2.4.3.5. Durchführung des CIEIA

Ähnlich wie der unter Punkt 2.4.3.4. beschriebene indirekte ELISA wurde der CIEIA durchgeführt. Dabei wurden die monoklonalen Antikörper in einem zusätzlichen Inkubationsschritt (90 min, bei 37°C) in der oben ermittelten Endkonzentration in gleichen Teilen mit PBS-Tween (Leerwert) bzw. mit PSE-Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-12} mol/l ($\log_{10}$ -Verdünnung) in PBS-Tween vorinkubiert. 50 ul dieser Ansätze wurden im folgenden ELISA getestet:

- Beschichtung (200 ul): 30 ug PSE-BSA/ ml Beschichtungspuffer (3 h bei 37°C + über Nacht bei 4°C)
- Vorinkubation: 25 ul PSE ($\log_{10}$ -Verdünnung) + 25 ul monoklonaler Antikörper (1,5 h)
- Vorinkubierte Probe: 50 ul/ Kavität (1,5 h)
- Konjugat: 50 ul Ziege-anti-Maus-IgG Peroxidase-Konjugat 1:500 (1,5 h)
- Substrat: 100 ul N-Salicylsäure (0,16 g/ 100ml Aqua bi-dest.) mit 0,005 % H_2O_2
- Nach 10 min mit 50 ul 1 N NaOH abgestoppt

Zur besseren Spreizung des Meßbereichs wurden für zwei monoklonale Antikörper exemplarisch PSE- $\log_2$ -Verdünnungen eingesetzt.

2.4.4. Untersuchungen über die Affinität und die Spezifität der monoklonalen Antikörper mit Hilfe des indirekten ELISA (2.4.3.4.)- bzw. des CIEIA (2.4.3.5.)-Systems

2.4.4.1. Abschätzung der Affinität

Nach van Heyningen (1986) stellt der 50 %- Wert der maximalen Antikörper-Antigen Bindung ein gutes Maß für die Affinität eines Antikörpers dar.

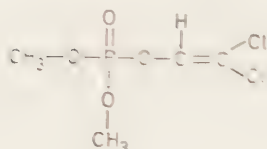
Beim indirekten ELISA (2.4.2.5.) wurde die Affinität der monoklonalen Antikörper zur PSE-BSA-Plattenbeschichtung aus der Antikörperkonzentration bei halbmaximaler Extinktion ermittelt. Für die Affinität zum freien PSE konnte der CIEIA (2.4.3.5.) herangezogen werden. Dabei war die 50 % Hemmung durch freies PSE bei konstanter Antikörperkonzentration maßgebend (Nieto et al., 1982).

2.4.4.2. Überprüfung der Spezifität

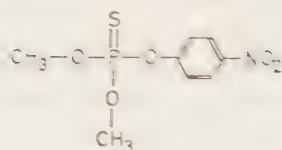
Die Spezifität der monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe des CIEIA (2.4.3.5.) überprüft. Dabei wurden die gewonnenen monoklonalen Antikörper jeweils mit verschiedenen Phosphorsäureestern auf Kreuzreaktionen getestet.

Die Phosphorsäureester Dichlorphos, Malathion, Methyl-Paraoxon, Methyl-Parathion und Trichlorphon (Abb.2) wurden ausgewählt, wobei bei der Auswahl auf die Häufigkeit der derzeitigen Verwendung und auf die jeweilige Strukturformel geachtet wurde.

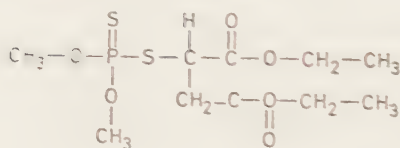
Dichlorphos (DDVP) MG: 220,3



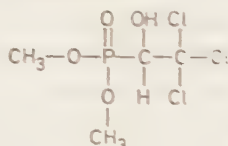
Methyl-Parathion MG: 263,2



Malathion MG: 330,4



Trichlorfon (Neguvon) MG: 257,5



Methyl-Paraoxon MG: 261,2

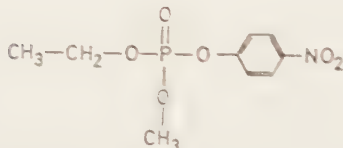


Abb.2: Strukturformeln der getesteten Phosphorsäureester

Die Phosphorsäureester wurden in einer Verdünnungsreihe in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-8} mol/l eingesetzt. Als Positivkontrolle diente PSE.

Malathion und Parathion wurden in folgendem ELISA-System in PBS-Tween mit 10 % Methanol, Dichlorphos, Paraoxon und Trichlorphos in PBS-Tween gelöst (in einem Kontrollversuch konnte nachgewiesen werden, daß 10 % Methanol keinen Einfluß auf die Antikörperaktivität gegen PSE hatte):

- Beschichtung: 30 µg PSE-BSA (200 µl)
- Probe: 25 µl Phosphorsäureester ($\log_{10}$ - Verdünnung) und 25 µl monoklonaler Antikörper
- Konjugat: Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper-Peroxidasekonjugat 1:500
- Substrat: N-Salicylsäure (0,16 g/ 100ml Aqua bidest.) mit 0,005 % H_2O_2
- Nach 10 min mit 1 N NaOH abgestoppt

2.4.5. Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA-Systems mit einem an Peroxidase gekoppelten monoklonalen Antikörper

Der Klon F71H10, der den höchst affinen Antikörper produzierte, führte nach intraperitonealer Applikation bei BALB/c-Mäusen zur Ausbildung von soliden Tumoren mit geringfügiger Ascitesbildung. Deshalb wurde für die weiteren Untersuchungen der Antikörper F71D7 verwendet.

2.4.5.1. Kopplung von Peroxidase an den monoklonalen Antikörper "F7 1 D7"

Die Kopplung von Meerrettich-Peroxidase (Fa. Boehringer, Mannheim) erfolgte nach Tijssen und Kurstak (1984) über die Perjodatreaktion.

Es wurden 2 mg Peroxidase in 0,5 ml Aqua bidest. gelöst. Anschließend wurden 0,1 ml frisch zubereitete 0,2 mol/l $NaIO_4$ -Lösung zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur durchmischt.

Die entstandene Peroxidase-Aldehyd-Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen 1 mmol/l Natriumacetatpuffer pH 4,5 dialysiert. Nach dem Einstellen des pH-Werts mit 0,2 mol/l Carbonatpuffer (pH 9,5) auf einen Bereich von 9 - 9,5 wurden sofort 4 mg des

monoklonalen Antikörpers F71D7, in 0,5 ml Carbonat/ Bicarbonat-Puffer (10 mmol/l; pH 9,5) gelöst, zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gemischt. Anschließend wurde 0,05 ml frisch zubereitete NaBH_4 -Lösung (4 mg/ml) hinzugefügt und 2 Stunden bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Letztendlich wurde die Lösung über Nacht gegen PBS pH 8 dialysiert.

2.4.5.2. Ermittlung der optimalen Antikörper- Peroxidasekonzentration beim Einsatz im indirekten ELISA

Die optimale Konzentration des an Peroxidase gekoppelten monoklonalen Antikörpers F71D7 wurde analog dem unter Punkt 2.4.3.4. beschriebenen System unter Verzicht des Ziege- anti-Maus- IgG Peroxidase- Konjugats durchgeführt:

- Beschichtung: 30 µg PSE- BSA/ ml Beschichtungspuffer pH 9,2
- Probe: Peroxidase- MAK F71D7 ($\log_2$ - Verdünnung, 1:100 vorverdünnt)
- Substrat: 0,16 g 5- Aminosalicylsäure/ 100 ml Aqua bidest.
mit 0,005 % H_2O_2

Als günstig wurde wiederum diejenige Antikörperkonzentration erachtet, bei der die Titrationskurve einen linearen Verlauf bei hoher Extinktion zeigte.

2.4.5.3. Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA

Die ELISA-Tests wurden analog Punkt 2.4.5.2. durchgeführt, wobei zusätzlich PSE in einer $\log_{10}$ - Verdünnung mit dem gekoppelten Antikörper bei 37°C für 90 bzw. 15 min in der oben ermittelten Endkonzentration inkubiert wurde.

2.4.6. Entwicklung eines direkten kompetitiven ELISA-Systems durch Einsatz von an Peroxidase gekoppeltem PSE

2.4.6.1. Kopplung von PSE an Peroxidase

Die Kopplung von PSE an Peroxidase wurde unter Einfügung des Tripeptids Glycin-Histidin-Lysin (Liver Cell Growth Factor, Fa. Serva, Heidelberg) als Spacer durchgeführt. Dabei wurde PSE diazotiert (Suttnar et al., 1977) und an die erste freie Aminogruppe des Spacers gekoppelt. Über die zweite freie Aminogruppe des Spacers erfolgte die Bindung an Peroxidase mit Hilfe der Perjodatreaktion nach Tijssen and Kurstak (1984).

Zur Diazotierung wurden 20 mg PSE in 2 ml 0,1 N HCl gelöst und tropfenweise 1 %ige NaNO₂-Lösung zugegeben. Die freiwerdende salpetrige Säure (HNO₂) wurde mit Kaliumjodidstärkepapier nachgewiesen. Die Diazotierung war nach einer 15minütigen positiven Jod-Stärke-Reaktion abgeschlossen.

Die Kopplung des diazotierten PSE an den Spacer erfolgte in mehreren Versuchsansätzen:

5 mg, 2,5 mg, 1,25 mg, 0,83 mg, 0,625 mg und 0,5 mg diazotiertes PSE wurden jeweils langsam zu 5 mg Spacer (in 1 ml gesättigter Boraxlösung pH 9,6 gelöst) zugegeben und 24 h bei 4°C zur Reaktion gebracht. Die Extinktion der jeweiligen Versuchsansätze wurde bei 350 nm gemessen. Derjenige Ansatz mit der höchsten Extinktion (5 mg PSE und 5 mg Spacer) wurde weiterverwendet. Anschließend wurden 25 mg BSA zum Abfangen der überschüssigen Diazo-Gruppen beigegeben.

Nach 18 Stunden erfolgte die Trennung von an Spacer gekoppeltem PSE von BSA und dessen Kopplungsprodukten über eine Sephadex G-25-Säule (1,25 x 25 cm) äquibriert mit Na-Carbonat-Puffer pH 9,2. Das Volumen der PSE-Spacer enthaltenden Fraktionen betrug insgesamt 4,3 ml.

Bei der Perjodatreaktion zur Kopplung von PSE-Spacer an Peroxidase wurden 4,0 mg Peroxidase (aus Meerrettich, Boehringer, Mannheim) in 4,0 ml frisch zubereiteter 0,1 mol/l Na-Bikarbonat-Lösung gelöst. Anschließend wurden 4 ml 16 mmol/l NaIO_4 -Lösung zugegeben und 2 h bei 20°C unter Lichtausschluß zur Reaktion gebracht. Nach Abtrennung der NaIO_4 -Lösung durch Ultrafiltration (Centricon Mikroconcentrator, Fa. Amicon, Danvers) wurde das Volumen der Proteinlösung mit 0,1 mol/l Na-Bikarbonat auf 4 ml eingestellt. Diese Peroxidasestammlösung wurde mit PSE-Spacer (s.o.) für 3 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dabei wurden in verschiedenen Ansätzen 0,5 ml Peroxidasestammlösung jeweils mit 0,5 ml (1:1/Abb.24), 0,25 ml (1:2), 0,125 ml (1:4), 0,083 ml (1:6), 0,063 ml (1:8) und 0,05 ml (1:10) PSE-Spacer-Stammlösung inkubiert. Das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze wurde mit Na-Carbonat-Lösung jeweils auf 1 ml eingestellt. Ein zusätzlicher Ansatz mit Perjodat-Peroxidase-Lösung (1 mg/ 0,5ml) und 0,5 ml PSE-Spacer-Lösung (konz. 1:2) wurde ebenfalls durchgeführt. Zu den jeweiligen Ansätzen wurden 50 µl einer frisch zubereiteten NaBH_4 -Lösung (5 mg/ ml 0,1mmol/l NaOH) zugegeben. Nach 30 Minuten wurden weitere 150 µl einer wiederum frisch zubereiteten NaBH_4 -Lösung gleicher Konzentration zugefügt und nach 1 Stunde Reaktionszeit gegen PBS pH 8 dialysiert. Das Endvolumen betrug nach der Dialyse 0,8 ml.

2.4.6.2. Ermittlung der optimalen PSE-Peroxidase-Konzentration für den Einsatz im direkten ELISA

Die jeweiligen PSE-Peroxidase-Kopplungsprodukte (2.4.6.1.) wurden 1:10 vorverdünnt und in $\log_2$ -Verdünnungsstufen im nachfolgend beschriebenen ELISA getestet.

Die ELISA-Platten wurden mit dem monoklonalen Antikörper F71D7 in einer Konzentration von 5 µg/ml (200 µl/Kavität) be-

schichtet (3 h bei 37°C und über Nacht bei 4°C) und anschließend mit 3 % BSA in PBS-Puffer pH 7,2 (200 ul/Kavität) 1 Stunde blockiert. Daraufhin wurden 50 ul PSE-Peroxidase-Lösung/Kavität in der oben erwähnten Verdünnungsreihe einpipettiert und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 9maligem Waschen (nach jedem Inkubationsschritt durchgeführt) wurden 100 ul 5-Aminosalicylsäure-Substrat (0,16 g/100 ml Aqua bidest.) mit 0,005 % H₂O₂ zugegeben. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 50 ul 1 N NaOH abgestoppt und im Titertek-ELISA-Reader ausgewertet.

Als optimal wurde diejenige PSE-Peroxidase-Konzentration angesehen, bei der die Titrationskurve einen linearen Verlauf bei hoher Extinktion zeigte.

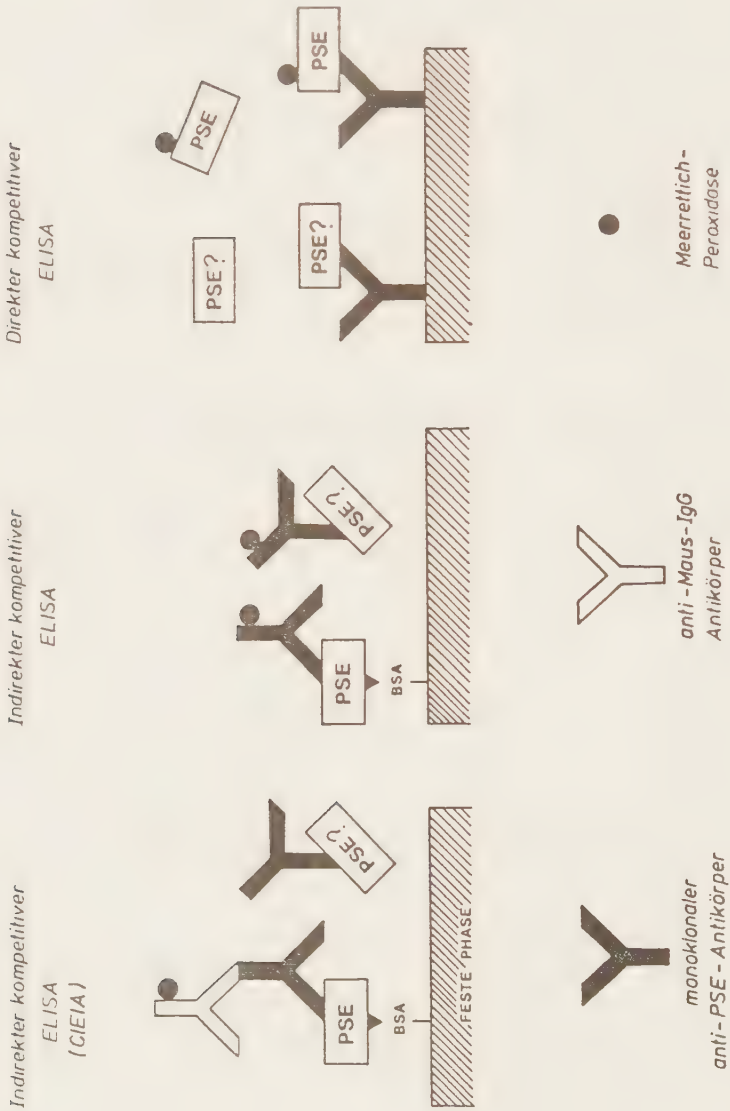
2.4.6.3. Durchführung des direkten kompetitiven ELISA-Systems

Der direkte kompetitive ELISA wurde analog Punkt 2.4.6.2. durchgeführt, wobei zusätzlich zur PSE-Peroxidase (optimale Konzentration unter Punkt 2.4.6.2. ermittelt) freies PSE in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde.

Der ELISA wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Beschichtung: 5 ug MAK F71D7/ml Beschichtungspuffer jeweils 200 ul/Kavität (3 h 37°C und über Nacht 4°C)
- Probe: 25 ul PSE-Peroxidase (1:130 verdünnt) und 25 ul PSE (log₁₀-Verdünnungsreihe) 90 bzw. 15 min inkubiert
- Substrat (100 ul/Kavität): 0,16 g 5-Aminosalicylsäure/100 ml Aqua bidest. mit 0,005 %iger H₂O₂ (nach 10 min. mit 50ul 1 N NaOH abgestoppt)
- Messung der Extinktion im Titertek-ELISA-Reader bei 492 nm

2.4.7. Schematische Darstellung der entwickelten ELISA-Systeme (Abb.3)



3. ERGEBNISSE

3.1. Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen PSE

3.1.1. Zellfusion

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen PSE wurden insgesamt 2 Fusionen durchgeführt, wobei bei der 1. Fusion 7×10^7 Milzzellen und bei der 2. Fusion 1×10^8 Milzzellen mit jeweils 1×10^7 Myelomzellen unter Einfluß von Polyethylen Glycol zur Fusion gebracht wurden.

Zellwachstum konnte bei Fusion 1 in 267 von 288 Kavitäten (92,7%), bei Fusion 2 in 347 von 384 Kavitäten (90,4%) festgestellt werden.

3.1.2. Screeningtest und Klonierung

Im Screeningtest wurden die Zellkulturüberstände jeweils auf haptenspezifische Antikörperaktivität mit dem indirekten ELISA (Punkt 2.4.2.5.) getestet. Als Plattenbeschichtung wurden PSE-HC und ungekoppeltes PSE eingesetzt.

Fusion 1:

Mit dem an HC gekoppelten PSE reagierten 38 von 267 Überständen (14,2%), und davon reagierten wiederum 7 (18,4%) bei Beschichtung mit ungekoppeltem PSE.

Fusion 2:

Die Fusion 2 wurde nach dem Aussäen bei -79°C bis zur Weiterverarbeitung konserviert (Wells and Bibb, 1986). Nach 4 Wochen wurde eine 96-Mikrowellplatte aufgetaut und die Kulturüberstände wurden auf anti-PSE-Antikörperaktivität getestet. Dabei reagierten bei Beschichtung der ELISA-Platten mit ungekoppeltem Hapten von 90 Kavitäten mit Zellwachstum 8 Überstände (8,9 %) positiv.

Mit Hilfe der "limiting dilution" -Methode wurden aus den zwei Fusionen fünf positive Kulturen kloniert und folgendermaßen bezeichnet:

F7 1 H9 / F7 1 H10 / F7 1 D7 / F7 1 B12 / F8 1 G2

3.1.3. Bestimmung der Immunglobulinklassen und -subklassen

Im Agar-Gel-Immundiffusionstest nach Ouchterlony (1962) konnten die monoklonalen Antikörper hinsichtlich ihrer Immunglobulinklassen und -subklassen folgendermaßen charakterisiert werden:

- F7 1 H9: IgG₁
- F7 1 H10: IgG₁
- F7 1 D7: IgG₁
- F7 1 B12: IgG_{2a}
- F8 1 G2: IgG₁

3.1.4. Produktion von monoklonalen Antikörpern über Ascites

Nach der intraperitonealen Applikation der 5 verschiedenen Hybridomzelllinien konnte je nach Klon und Maus unterschiedlich zwischen dem 6. und 14.Tag (Ausnahme F7lH10) mit der 1.Abnahme von Ascites begonnen werden. Wie aus Tab.1 ersichtlich ist, konnte je nach Maus und Klon unterschiedlich viel Ascites gewonnen werden. Die Zahl der Abnahmen schwankte zwischen 2 und 7, wobei die Überlebensdauer der Mäuse nach der 1. Abnahme zwischen 4 und 11 Tagen variierte. Teilweise konnten insgesamt bis zu 20 ml Ascites pro Maus gewonnen werden.

Tab 1: Ascitesgewinnung bei BALB/c-Mäusen

Klon	Maus	Geschlecht	Menge (in ml)	Zahl der Abnahmen	Tag der ersten/ letzten Abnahme
F71D7	1	♀	9,0	5	9 / 16
	2	♂	9,8	3	8 / 13
	3	♀	11,6	5	14 / 23
	4	♀	4,0	2	10 / 14
	5	♀	4,7	4	14 / 21
	6	♀	5,6	3	14 / 17
F71H9	1	♀	5,1	4	9 / 15
	2	♀	6,5	4	9 / 15
	3	♀	4,7	3	9 / 15
	4	♂	14,4	4	7 / 14
	5	♂	20,0	6	10 / 21
	6	♂	7,6	5	12 / 21
F71B12	1	♀	8,8	7	9 / 17
	2	♀	12,5	5	9 / 15
	3	♂	10,8	5	8 / 14
	4	♂	7,1	3	11 / 13
	5	♂	6,9	4	11 / 16
	6	♂	7,8	4	10 / 17
F81G2	1	♂	5,7	4	6 / 12
	2	♂	4,6	5	6 / 13
	3	♀	6,0	3	10 / 14
	4	♀	5,0	3	10 / 14
	5	♀	4,6	3	10 / 14
F71H10	1	♀	6,6	4	32 / 39
	2	♀	1,2	2	22 / 25
	3	♀	1,0	4	30 / 38

3.1.5. Reinigung der monoklonalen Antikörper aus dem Ascites über Protein-A-Sepharose

Die Isolierung der monoklonalen Antikörper aus Ascites wurde mittels Affinitätschromatographie über Protein-A-Sepharose durchgeführt. Abb.4 und 5 zeigen deutlich die unterschiedliche pH-Abhängigkeit der Elution der verschiedenen IgG-Subtypen. IgG₁ (Abb.4) wurde schon mit Citratpuffer pH 6 eluiert, während zur Elution von IgG_{2a} (Abb.5) pH 5 notwendig war.

Die proteinhaltigen Fraktionen (E_{280 nm}) wurden jeweils vereint und gegen PBS pH 8 dialysiert.

Die Proteinbestimmung (Bradford, 1976) der einzelnen Pools ergab die in Tab.2 dargestellte Ausbeute:

Tab.2: Isolierung der monoklonalen Antikörper aus dem Ascites der 1.Abnahme mit Hilfe von Protein-A-Sepharose

	F71D7 Maus 6	F81G2 Maus 4	F71H10 Maus 1	F71H9 Maus 1	F71B12 Maus 6
IgG-Subklasse	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG ₁	IgG _{2a}
pH Elutions- puffer	pH 6	pH 6	pH 6	pH 6	pH 5
Gesamtmenge 1.Abnahme (ml)	3,3	3,1	0,9	1,2	3,7
Antikörper- Konzentration (mg/ml Ascites)	9,4	8,4	11,2	3,8	9,2



Abb.4: Isolierung des monoklonalen Antikörpers F7LD7 (IgG₁) aus 0,5 ml Ascites über Protein- A- Sepharose (1 ml/ Fraktion)



Abb.5: Isolierung des monoklonalen Antikörpers F71B12 (IgG_{2a}) aus 0,5 ml Ascites über Protein- A- Sepharose (1 ml/ Fraktion)

3.2. Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA-Systems (CIEIA) zum Nachweis von PSE mit Hilfe der gewonnenen monoklonalen Antikörper

3.2.1. Optimierung der Versuchsbedingungen

Die Beschichtungen PSE-BSA, PSE-HSA, PSE-HC und PSE wurden im indirekten ELISA vergleichend getestet. Dabei wurde die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers F71D7 zur Plattenbeschichtung in einer $\log_2$ -Verdünnungsreihe ausgewertet und die jeweiligen Titer wurden bei der Extinktion von 0,1 bestimmt. Die Titrationskurven des Antikörpers F71D7 bei den verschiedenen Plattenbeschichtungen sind in Abb.6 dargestellt. Mit der Beschichtung PSE-BSA konnten bei den entsprechenden Verdünnungsstufen die jeweils höchsten Extinktionen erreicht werden. Die Titrationskurven zeigen einen typisch sigmoiden Verlauf.

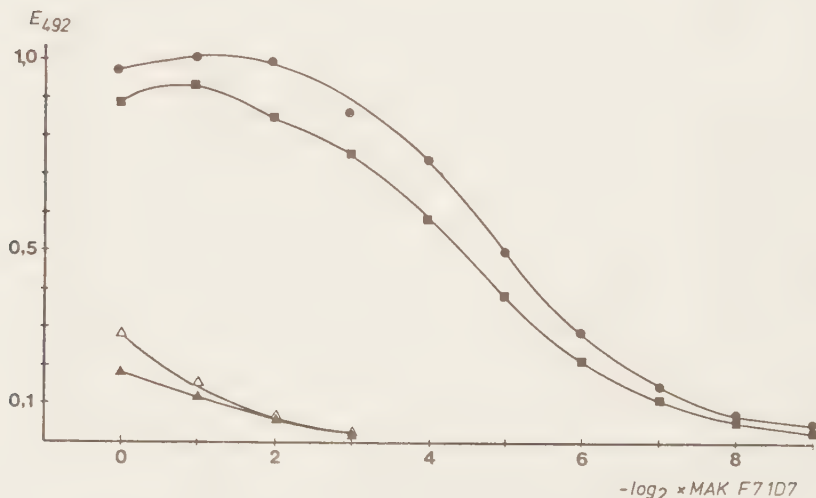


Abb.6: Titrationskurven des monoklonalen Antikörpers F71D7 bei Plattenbeschichtung mit PSE-BSA (●), PSE-HSA (■), PSE-HC (Δ) und PSE (▲)

Die Austestung unterschiedlicher PSE-BSA-Beschichtungskonzentrationen zwischen 10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ erbrachten keine wesentlichen Unterschiede (Abb.7). Für weitere Untersuchungen wurde eine Beschichtungskonzentration von 30 μg PSE-BSA/ml Beschichtungspuffer verwendet.

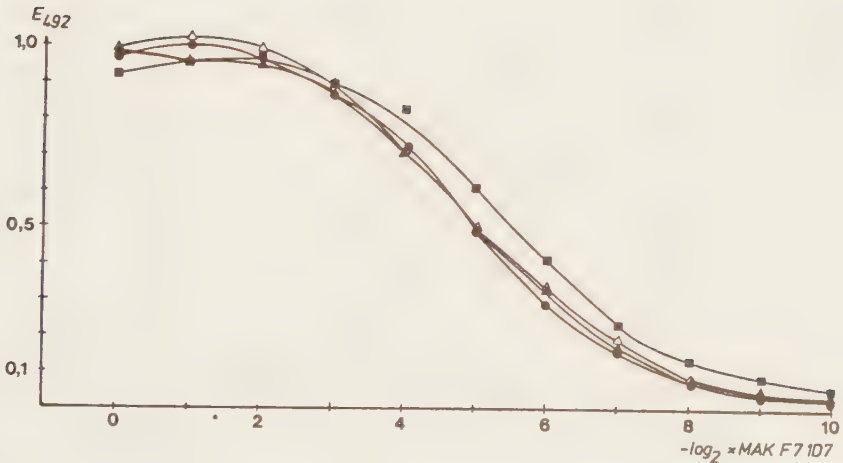


Abb.7: Titrationskurven des monoklonalen Antikörpers F71D7 bei unterschiedlichen PSE-BSA-Plattenbeschichtungskonzentrationen

▲ = 10 $\mu\text{g/ml}$ ● = 30 $\mu\text{g/ml}$ △ = 60 $\mu\text{g/ml}$ ■ = 100 $\mu\text{g/ml}$

Im entsprechenden ELISA-System wurden anti-Maus-IgG Peroxidasekonjugatverdünnungen von 1 : 500, 1 : 1 000, 1 : 2 000 und 1 : 5 000 untersucht. Die Verdünnung von 1 : 500 erreichte dabei die höchsten Extinktionen (Abb.8) und wurde in den folgenden Untersuchungen eingesetzt.

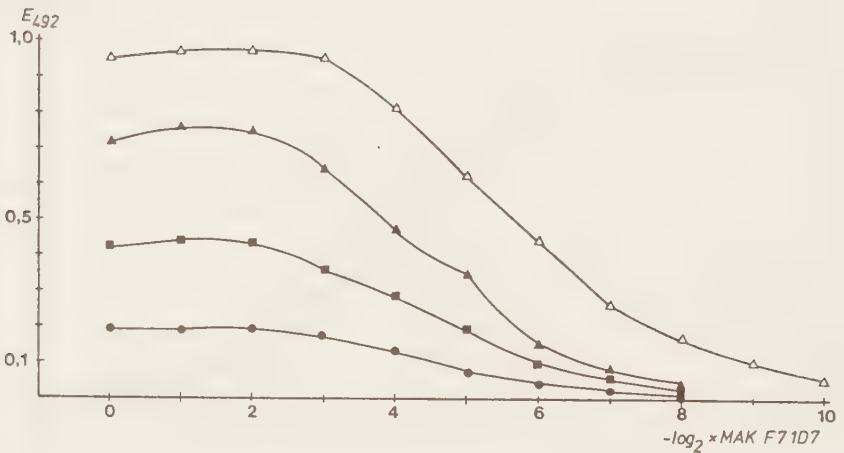


Abb.8: Titrationskurven des monoklonalen Antikörpers F71D7 bei unterschiedlichen Ziege-anti-Maus-IgG Peroxidasekonjugatverdünnungen

($\bullet$) = 1:5000 ($\blacksquare$) = 1:2000 ($\blacktriangle$) = 1:1000 (Δ) = 1:500

Darüber hinaus wurde die Substratkonzentration von 0,16 g N-Salicylsäure/100 ml Aqua bidest. mit der im Screeningtest verwendeten Konzentration von 0,08 g/100 ml verglichen, wobei die Konzentration von 0,16 g/100 ml empfindlichere Ergebnisse lieferte (Abb.9).

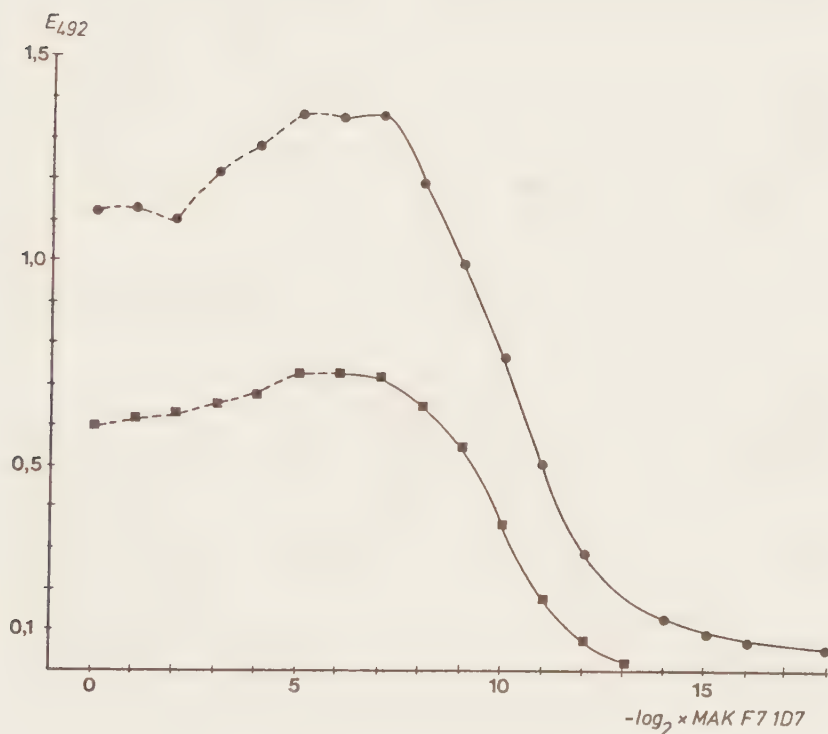


Abb.9: Vergleich verschiedener Substratkonzentrationen unter Einsatz des monoklonalen Antikörpers F71D7

- = 0,08 g N-Salicylsäure/ 100ml Aqua bidest.
- = 0,16 g N-Salicylsäure/ 100ml Aqua bidest.

Zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration für den Einsatz im CIEIA wurden die 5 monoklonalen anti-PSE-Antikörper in $\log_2$ -Stufen verdünnt und auf ihre Bindungsfähigkeit zur PSE-BSA-Plattenbeschichtung unter optimierten Bedingungen getestet.

Abb.10 zeigt die dabei erhaltenen Titrationskurven der monoklonalen Antikörper F71D7 und F71H9. Die Titrationskurven der monoklonalen Antikörper F71H10, F71B12 und F81G2 entsprechen der des monoklonalen Antikörpers F71D7.

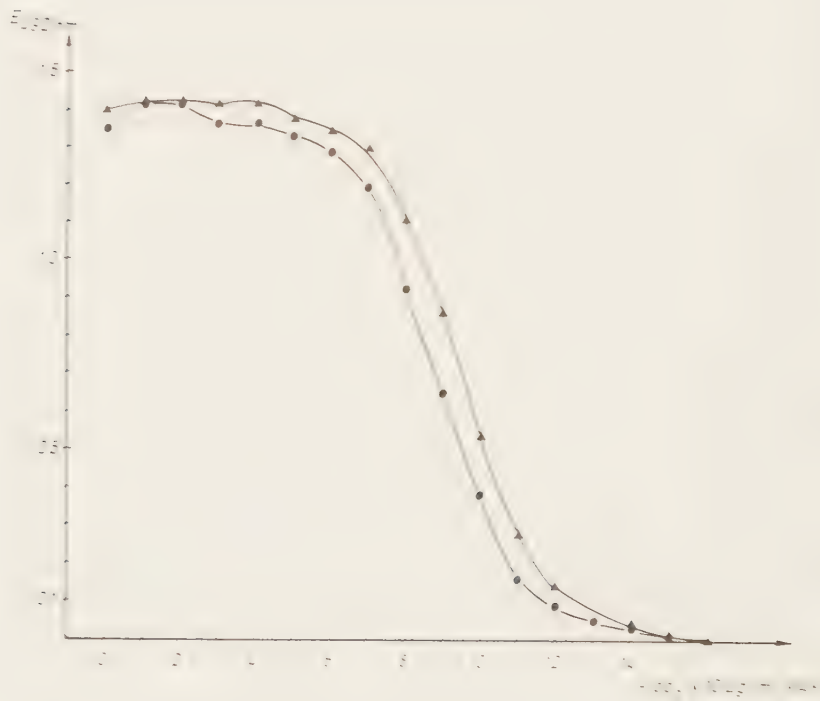


Abb.10: $\log_2$ -Titrationskurve der Antikörper F71H9 ● und F71B12 ▲ ausgehend von einer Antikörperkonzentration von 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$

Als optimal für die weitere Verwendung im CIEIA wurde die Antikörperkonzentration erachtet, bei der die Titrationskurve im linearen Bereich lag und die Antikörperkonzentration gerade noch nicht zur Absättigung der Plattenbeschichtung führte.

Diese Extinktion (1,6) wurde bei folgender Antikörperkonzentration erhalten:

- P7 1 H10: 27,6 ng/ml
- P7 1 H9: 44,9 ng/ml
- P7 1 D7: 27,6 ng/ml
- P7 1 B12: 27,6 ng/ml
- P8 1 G2: 27,6 ng/ml

3.2.2. Durchführung des CIEIA

Die monoklonalen Antikörper wurden in einem zusätzlichen Inkubationsschritt in der unter Punkt 3.2.1. beschriebenen Endkonzentration mit PBS-Tween bzw. PBS-Konzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-12} mol/l PBS-Tween 90 Minuten bei 37°C inkubiert und daraufhin im CIEIA (Punkt 2.4.3.5.) getestet.

Die mit den 5 verschiedenen monoklonalen Antikörpern erhaltenen Hemmkurven sind in Abb.11 dargestellt. Die Extinktion einer Ungesamten Probe (Inkubation mit PBS-Tween) wurde bei der Berechnung der Hemmwirkung als 100 % Aktivität angenommen. Die erhaltenen Messpunkte entsprechen den Mittelwerten aus 8fach-Ansätzen. Die Standardabweichung war stets $< 4,6$ %.



Abb.11:Hemmung von monoklonalen Antikörpern durch freies PSE
im CIEIA ($\log_{10}$ -Verdünnungsreihe)

- = F81G2
- = F71H9
- = F71B12
- = F71D7
- △ = F71H10

In Tab.3 sind die ermittelten PSE-Konzentrationen für 10% (IC₁₀), 50% (IC₅₀) und 90% (IC₉₀) Hemmung der jeweiligen Antikörperaktivität aufgeführt.

Tab.3: Konzentration von PSE (mol/l) bei 10 % Hemmung, 50 % Hemmung und 90 % Hemmung der Antikörperaktivität

	PSE-IC ₉₀	PSE-IC ₅₀	PSE-IC ₁₀
F71H10	1,47x10 ⁻⁵	2,51x10 ⁻⁶	5,41x10 ⁻⁷
F71D7	1,85x10 ⁻⁵	3,16x10 ⁻⁶	6,81x10 ⁻⁷
F71B12	3,16x10 ⁻⁵	5,01x10 ⁻⁶	1,08x10 ⁻⁶
F71H9	2.33x10 ⁻⁴	5,01x10 ⁻⁵	1,17x10 ⁻⁵
F81G2	2,15x10 ⁻³	4,30x10 ⁻⁴	1,08x10 ⁻⁴

Zur besseren Spreizung des Meßbereichs wurden für zwei monoklonale Antikörper (F71D7 und F81G2) exemplarisch PSE-log₂-Verdünnungen eingesetzt. In Abb.12 und Abb.13 sind die entsprechenden Hemmkurven dargestellt.



Abb.12: Hemmung des monoklonalen Antikörpers F71D7 durch freies PSE im CIEIA (log₂-Verdünnung)

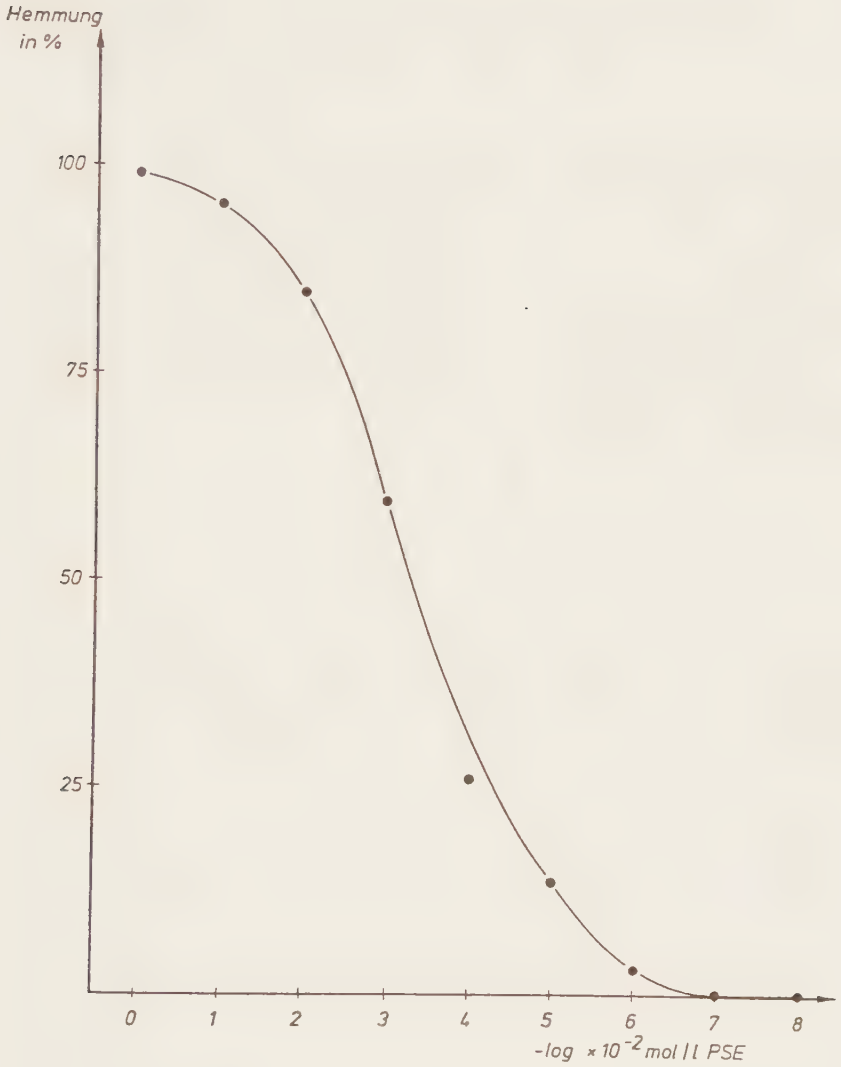


Abb.13: Hemmung des monoklonalen Antikörpers F81G2 durch freies PSE im CIEIA ($\log_2$ -Verdünnung)

3.3. Untersuchungen über die Affinität und Spezifität der monoklonalen Antikörper

3.3.1. Abschätzung der Affinität

Für die Abschätzung der Affinität zur PSE-BSA-Plattenbeschichtung wurde der indirekte ELISA (2.4.3.4. bzw. 3.2.1.) herangezogen. Als Maß diente die Antikörperkonzentration, bei der eine halbmaximale Extinktion erreicht wurde. Die 4 monoklonalen Antikörper F71H10, F71D7, F71B12 und F81G2 zeigten die gleiche Affinität zur PSE-BSA-Beschichtung im Gegensatz zu F71H9, der dieselbe Extinktion erst bei höherer Konzentration erreichte (Tab.4).

Tab.4: Antikörperkonzentration bei halbmaximaler Extinktion

	halbmaximale Extinktion	Antikörperkonzentration
F71H10	0,715	14,3 ng / ml
F71D7	0,715	14,3 ng / ml
F71B12	0,715	14,3 ng / ml
F71H9	0,715	23,2 ng / ml
F81G2	0,715	14,3 ng / ml

Die Abschätzung der Affinität der monoklonalen Antikörper zu freiem PSE wurde mit dem CIEIA durchgeführt.

Als Maß für die Affinität diente dabei diejenige PSE-Konzentration, bei der 50 % der Antikörperaktivität (IC_{50}) gehemmt wurden (s.Tab.3).

Für die verschiedenen monoklonalen Antikörper ergaben sich folgende PSE-Konzentrationen:

- F71H10: $2,51 \times 10^{-6}$ mol/l PSE
- F71D7 : $3,61 \times 10^{-6}$ mol/l PSE
- F71B12: $5,01 \times 10^{-6}$ mol/l PSE
- F71H9 : $5,01 \times 10^{-5}$ mol/l PSE
- F81G2 : $4,30 \times 10^{-4}$ mol/l PSE

3.3.2. Überprüfung der Spezifität

Mit Hilfe des CIEIA wurde die Spezifität der 5 monoklonalen Antikörper nach Inkubation mit Dichlorphos, Malathion, Methyl-Paraoxon, Methyl-Parathion und Trichlorphon im Vergleich zum PSE überprüft.

Abb.14 bis 18 zeigen, daß durch die oben genannten Phosphorsäureester keine Hemmung der Antikörperaktivität möglich war. Die Extinktion erreichte auch mit zunehmender Konzentration des jeweiligen Phosphorsäureesters das gleiche Niveau. Lediglich Malathion hemmte den Antikörper F71H9 geringgradig bei einer Konzentration von 10^{-3} mol/l. Die prozentuale Extinktion nahm dabei um 25 % ab.

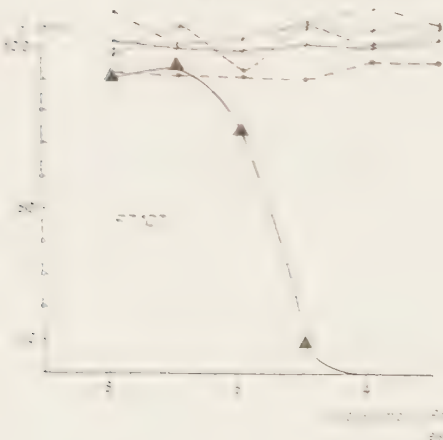
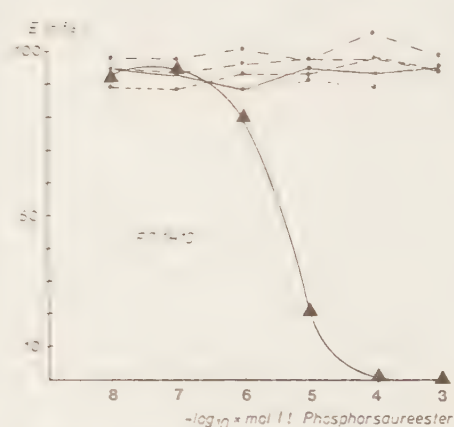
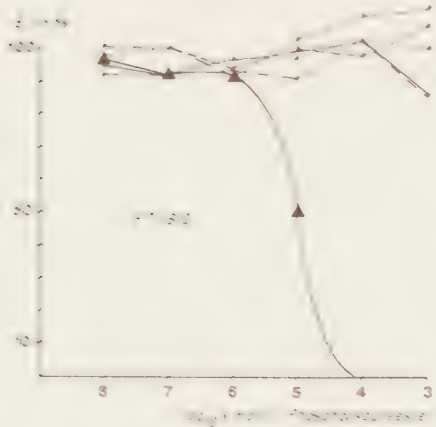
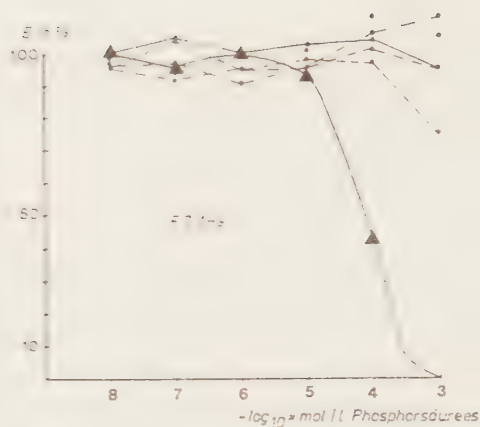
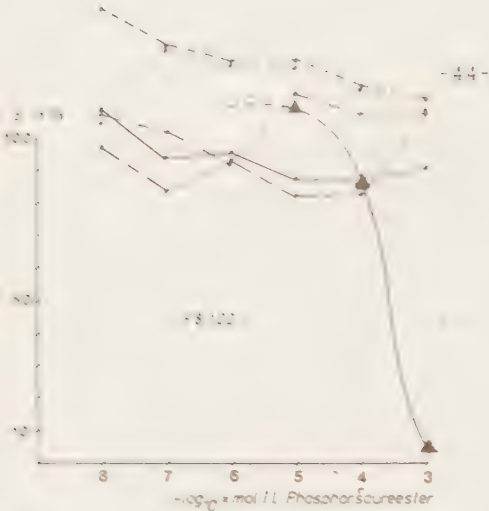


Abb.14-18:

Überprüfung der Spezifität der verschiedenen monoklonalen Antikörper gegenüber folgenden Phosphorsäureestern:

- ▲ — ▲ PSE
- — — Dichorpos
- - - - - Malathion
- · - · - Paraoxon
- - - - - Parathion
- · · · · Trichlorphon

3.4. Entwicklung eines indirekten kompetitiven ELISA mit an Peroxidase gekoppeltem monoklonalen Antikörper

3.4.1. Ermittlung der optimalen Antikörper- Peroxidase-konzentration beim Einsatz im indirekten ELISA

Der an Peroxidase gekoppelte monoklonale Antikörper F71D7 (siehe Material und Methoden 2.4.5.1.) wurde 1:100 mit PBS-Tween verdünnt und im unter Punkt 2.4.5.2. beschriebenen System in $\log_2$ - Verdünnungsstufen ausgetestet.

Der entsprechende Verlauf der Titrationskurve ist der Abb.19 zu entnehmen. Ein linearer Zusammenhang zwischen Antikörperkonzentration und Extinktion konnte im Bereich von 2 μg gekoppeltem Antikörper/ ml bis 0,25 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden. Für den Einsatz im indirekten kompetitiven ELISA-System wurde eine Konzentration des gekoppelten Antikörpers F71D7 von 1 $\mu\text{g/ml}$ (d.h. Verdünnung von 1:1600 der Stammlösung aus dem Kopplungsansatz) als günstig erachtet, bei der eine Extinktion von 1,0 erreicht wurde (Abb.19).

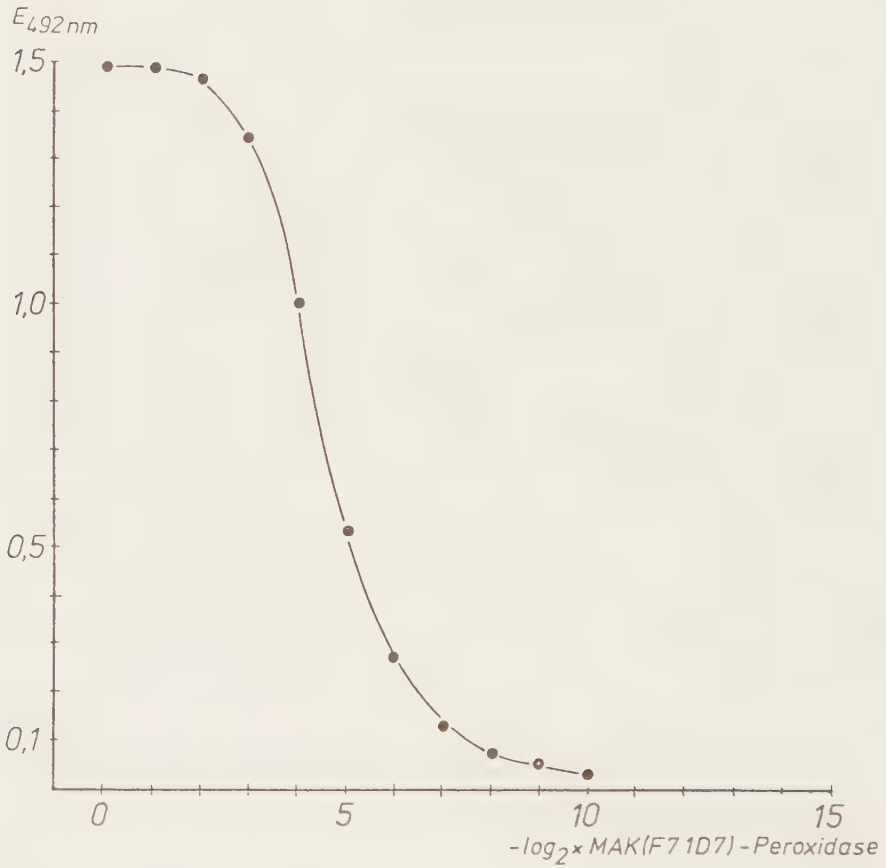


Abb.19: $\log_2$ -Titrationskurve des monoklonalen Antikörpers F71D7 gekoppelt an Peroxidase ausgehend von einer Vorverdünnung der Stammlösung (1,6 mg/ ml) von 1:100

3.4.2. Durchführung des indirekten kompetitiven ELISA

In diesem System wurde der an Peroxidase gekoppelte monoklonale Antikörper F71D7 in der vorher ermittelten Endkonzentration mit der zu testenden PSE- Probe ($\log_{10}$ - Verdünnungsreihe) 90 min vorinkubiert. Anschließend wurden 50ul der vorinkubierten Probe jeweils in eine Kavität der mit PSE- BSA beschichteten ELISA-Platte pipettiert, und die verbliebene Antikörperaktivität, wie unter Punkt 2.4.5.3. dargestellt, bestimmt.

Dieses ELISA- System wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Abb.20 zeigt die erhaltenen Hemmkurven nach 90minütiger Reaktionszeit der Probe mit der ELISA- Plattenbeschichtung, Abb.21 die entsprechende Kurve nach 15minütiger Reaktionszeit.

Aus beiden Abbildungen ist zu entnehmen, daß eine Hemmung der Antikörperaktivität mit PSE-Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-7} mol/l erreicht wurde. Die PSE-Konzentrationen bei 90%, 50% und 10% Hemmung (IC-Werte) sind Tab.5 zu entnehmen. Die in der Tabelle aufgeführten Gesamtzeiten berücksichtigen 90 Minuten Vorinkubation und 10 Minuten Substratinkubation. Die erhaltenen Meßwerte entsprechen den Mittelwerten aus 8-fach Ansätzen. Die Standardabweichung war stets $< 3,4$ (190 min Gesamtdauer) bzw. $< 4,1$ (115 min Gesamtdauer)

Tab.5: PSE-Konzentration (mol/l) bei 90 %, 50 % und 10 % Hemmung der Antikörperaktivität (F71D7) im indirekten ELISA

	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₁₀
Gesamtdauer 190min	$1,58 \times 10^{-4}$	$1,40 \times 10^{-5}$	$3,10 \times 10^{-7}$
Gesamtdauer 115min	$1,00 \times 10^{-3}$	$6,31 \times 10^{-6}$	$3,10 \times 10^{-7}$

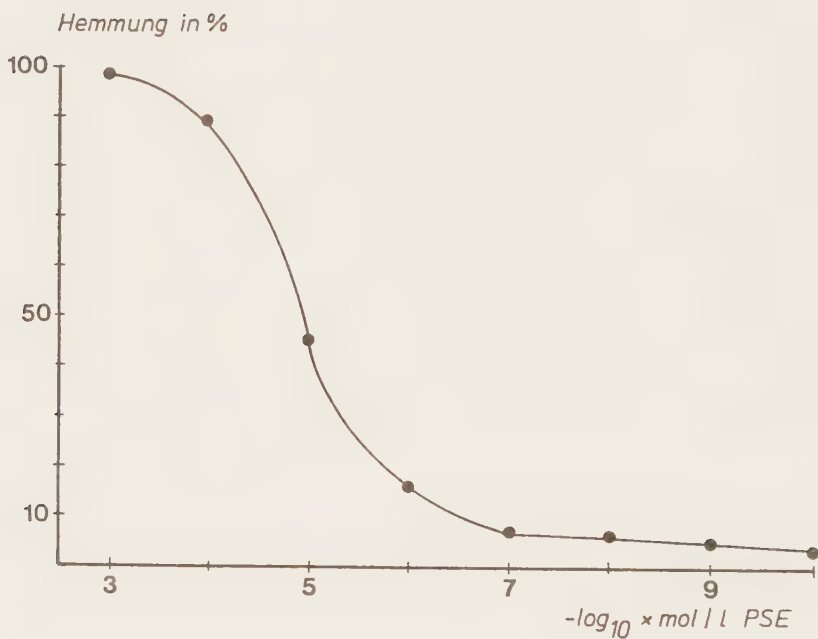


Abb.20: Hemmung von an Peroxidase gekoppeltem Antikörper F71D7 durch freies PSE im indirekten ELISA (Inkubationszeit der Probe: 90 min)

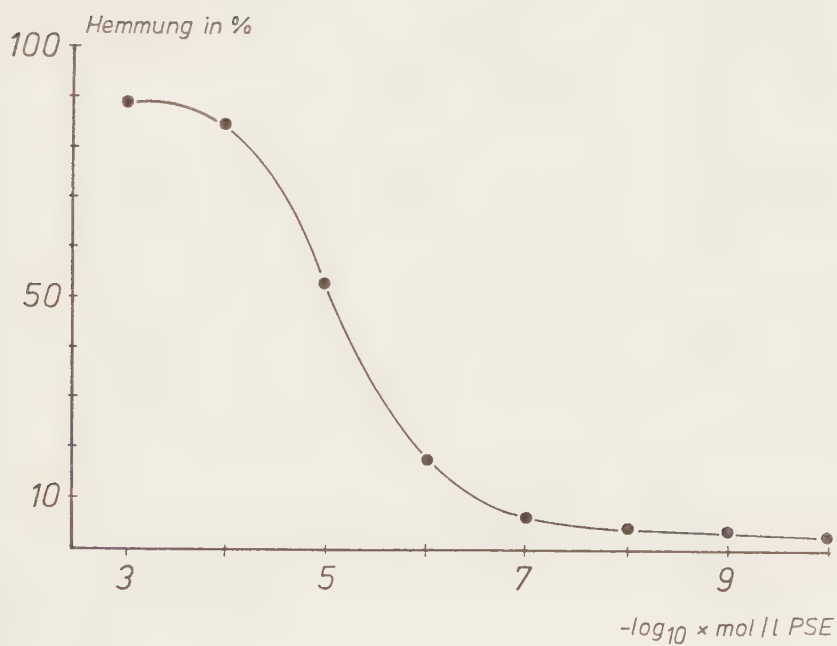


Abb.21: Hemmung von an Peroxidase gekoppeltem Antikörper F71D7 durch freies PSE im indirekten ELISA (Inkubationszeit der Probe: 15 min)

3.5. Entwicklung eines direkten kompetitiven ELISA-Systems durch Einsatz von an Peroxidase gekoppeltem PSE

3.5.1. Kopplung von PSE an Peroxidase

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde PSE über eine vorgeschaltete Diazotierung in mehreren Versuchsansätzen (Tab.6) an den Spacer Gly-His-Lys gekoppelt.

Für PSE, Spacer und das Kopplungsprodukt PSE-Spacer wurde ein UV-Spektrum erstellt (Abb.22), um den Kopplungserfolg und die Kopplungsausbeute zu bestimmen. Beim Extinktionsmaximum (350nm) wurden die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze miteinander verglichen (Tab.6).

Tab.6: Extinktion der verschiedenen Kopplungsprodukte (PSE-Spacer) bei 350nm

Kopplungspartner	E ₃₅₀ des PSE-Spacers (1:10 vorverd.)
5,00mg PSE + 5mg Spacer	2,408
2,50mg PSE + 5mg Spacer	1,706
1,25mg PSE + 5mg Spacer	1,084
0,83mg PSE + 5mg Spacer	0,734
0,63mg PSE + 5mg Spacer	0,576
0,50mg PSE + 5mg Spacer	0,409

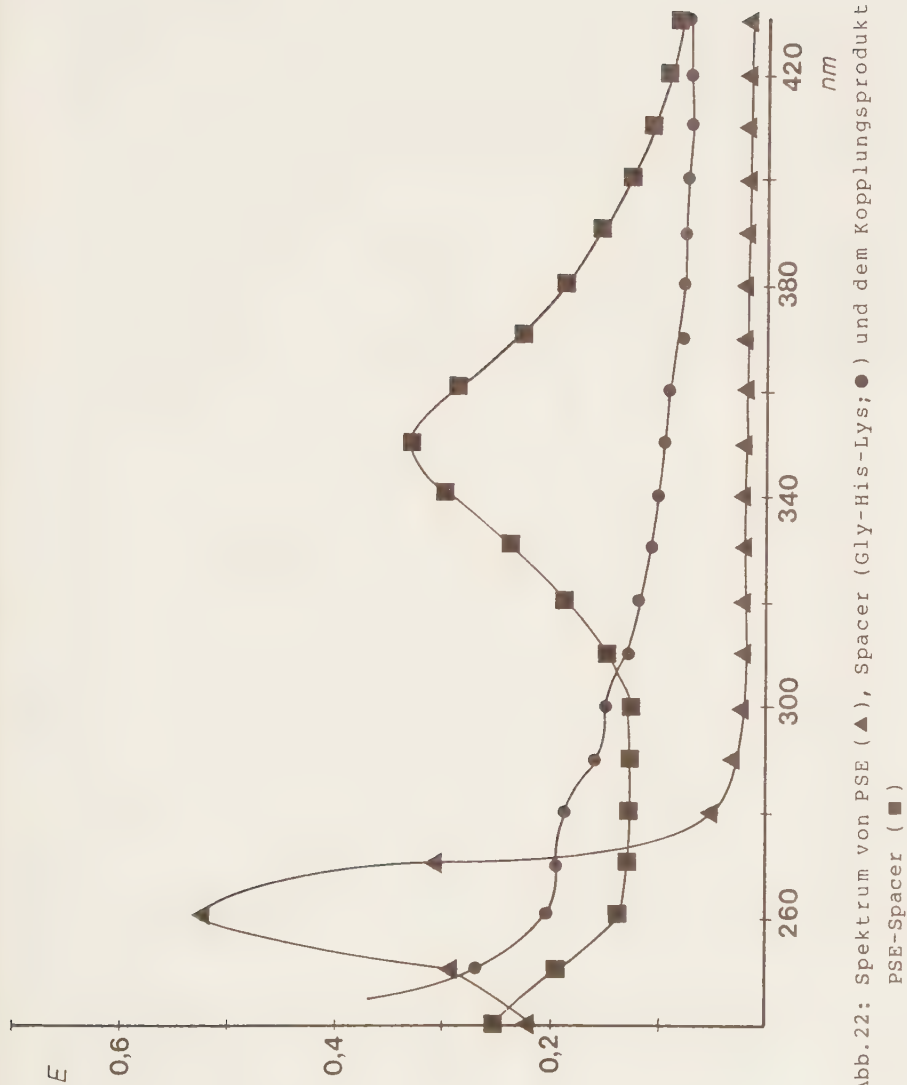


Abb.22: Spektrum von PSE ($\blacktriangle$), Spacer (Gly-His-Lys; $\bullet$) und dem Kopplungsprodukt PSE-Spacer ($\blacksquare$)

In einem weiteren Reaktionsschritt wurde aus dem Ansatz mit der höchsten Extinktion (höchste Kopplungsquote) ungekoppeltes, diazotiertes PSE durch Zugabe von 25mg BSA entfernt. Mit Hilfe einer Sephadex-G-25-Säule wurden die Reaktionsprodukte voneinander getrennt. Der Verlauf der chromatographischen Trennung ist in Abb.23 dargestellt. Der erste Peak (280nm) stellt die BSA-haltigen Fraktionen dar, der zweite (350nm) die Elution von PSE-Spacer.

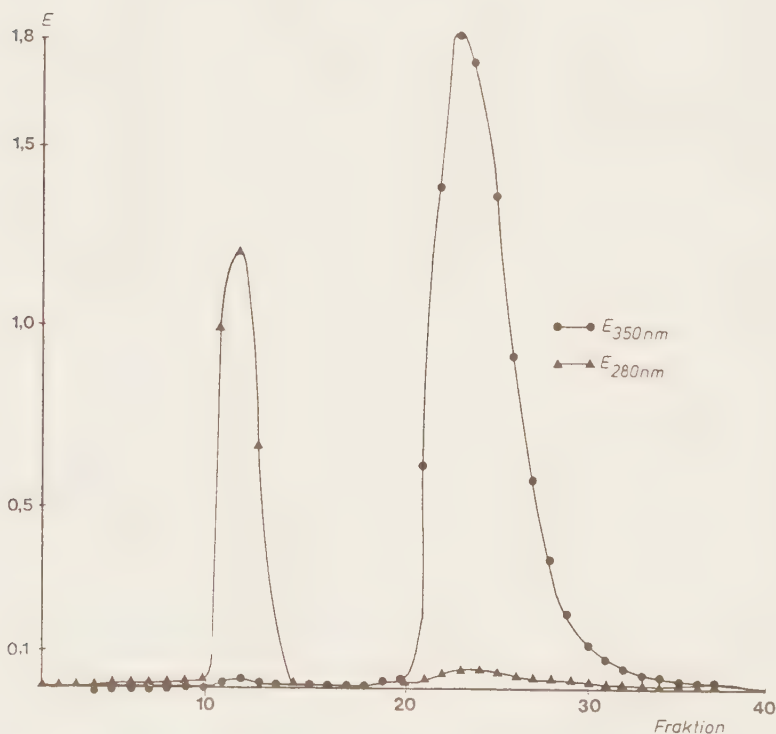


Abb.23: Chromatographische Trennung der BSA-haltigen Fraktionen (Peak 280nm) und des PSE-Spacers (Peak 350nm) mit Hilfe von Sephadex-G-25

In einem weiteren Kopplungsschritt wurde das isolierte PSE-Spacer-Konjugat über Periodatreaktion an Meerrettichperoxidase gebunden. Dabei wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mehrere Versuchsansätze durchgeführt, um die für den Test optimalen Kopplungsbedingungen zu erhalten. Die entsprechenden Kopplungsprodukte wurden auf ihre Verwendbarkeit im ELISA getestet, wobei die Bindungsfähigkeit der jeweiligen Konjugate an die mit monoklonalen Antikörpern beschichtete ELISA-Platte untersucht wurde.

Die Titrationskurve (Abb.24) zeigt je nach eingesetzter Konzentration des PSE-Spacers bzw. der Peroxidase einen unterschiedlichen Verlauf. Bei gleicher Proteinkonzentration der Kopplungsprodukte wurden im ELISA umso höhere Extinktionen erzielt, je höher die PSE-Spacer-Konzentration im Kopplungsansatz war.



Abb. 24: $\log_2$ -Titrationsskurven von PSE Peroxidase (1:10 vorverdünnt) im indirekten ELISA / Erläuterung der Kopplungskonzentrationen siehe Material und Methoden unter Punkt 2.4.6.1

3.5.2. Durchführung des direkten kompetitiven ELISA

Die PSE-Peroxidase der verschiedenen Kopplungsansätze wurde in der Konzentration im direkten ELISA eingesetzt, die einer Extinktion von 1,0 entsprach (Abb.24). Dabei erbrachte die kompetitive Verdrängung von PSE-Peroxidase (in der oben genannten Konzentration) durch freies PSE ($\log_{10}$ -Verdünnungsreihe) keine Unterschiede bezüglich des Verlaufs der Hemmkurven.

Beispielhaft ist in Abb.25 die Hemmkurve des Kopplungsproduktes aus 1mg Peroxidase und 0,5ml PSE-Spacer (siehe Material und Methoden Punkt 2.4.6.1.) bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten dargestellt. Die entsprechenden Meßpunkte entsprechen den Mittelwerten aus 8fach-Ansätzen. Die Standardabweichung war stets $< 5,3$.

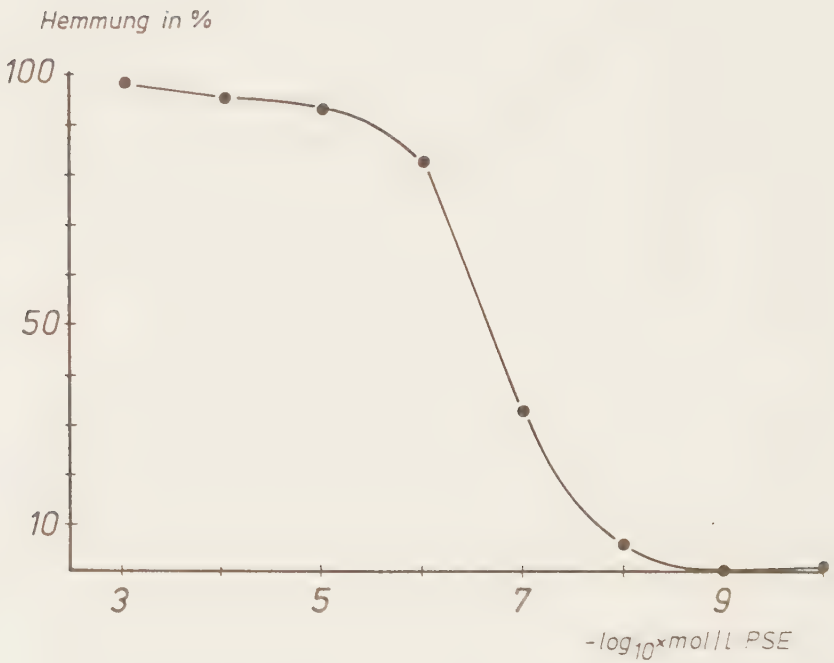


Abb.25: Hemmung von PSE-Peroxidase (1:130 vorverdünnt) durch freies PSE im direkten kompetitiven ELISA (Inkubationszeit der Probe: 90 min)

Zusätzlich wurde der ELISA mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten (8fach-Ansatz) durchgeführt. Der entsprechende Kurvenverlauf ist in Abb.26 dargestellt. Die Standardabweichung war stets $< 6,5$.

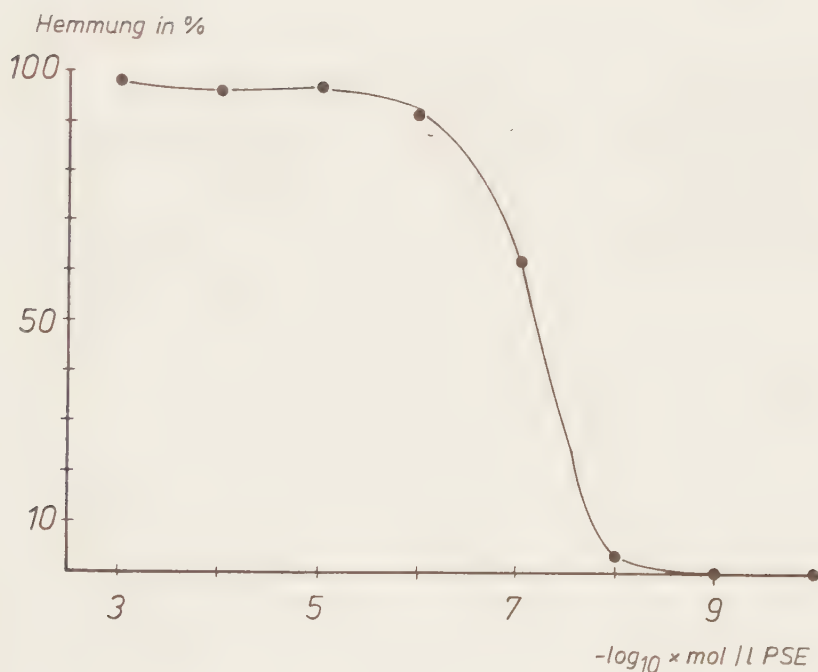


Abb.26: Hemmung von PSE-Peroxidase (1:130) vorverdünnt durch freies PSE im direkten kompetitiven ELISA (Inkubationszeit der Probe: 15 min)

In folgender Tabelle sind die PSE-Konzentrationen in mol/l aufgelistet, die jeweils einer Hemmung von 90%, 50% und 10% entsprachen. Die aufgeführten Gesamtzeiten berücksichtigen jeweils 10 Minuten Substratinkubation.

Tab.7: PSE-Konzentration (mol/l) bei 90 %, 50 % und 10 % Hemmung der Antikörperaktivität (F71D7) im direkten ELISA

	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₁₀
Gesamtdauer 100min	$3,61 \times 10^{-6}$	$2,51 \times 10^{-7}$	$3,16 \times 10^{-8}$
Gesamtdauer 25min	$7,94 \times 10^{-7}$	$7,94 \times 10^{-8}$	$3,16 \times 10^{-8}$

3.6. Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen entwickelten ELISA-Nachweissysteme für PSE

Abschließend werden die unterschiedlichen ELISA-Systeme in einer zusammenfassenden Tabelle gegenübergestellt. In Tab.8 sind die einzelnen Testschritte unter den verschiedenen Bedingungen dargestellt. Die Nachweisgrenzen für PSE (mol/l) sind dem unteren Tabellenabschnitt zu entnehmen.

Tab.8: ELISA- Nachweissysteme für PSE

	Indirek. komp. ELISA (CIEIA)	Indirek. komp. ELISA	Direkt. komp. ELISA
Beschichtung	PSE- BSA (3h 37°C + übernacht 4°C)	PSE- BSA (3h 37°C + übernacht 4°C)	MAK F71D7 (3h 37°C + übernacht 4°C)
Blockierung	/	/	BSA (1h)
Vorinkubation	MAK + PSE (1,5h)	MAK-Peroxidase + PSE (1,5h)	/
Proben	MAK/PSE+MAK (1,5h)	MAK-Peroxidase/ PSE + MAK-Perox (1,5h /*15min)	PSE-Peroxidase + PSE (1,5h /*15min)
Konjugat	anti-Maus-IgG Peroxidase- Antikörper(1,5h)	/	/
Substrat	N-Salicyls. (10min)	N-Salicyls. (10min)	N-Salicyls. (10min)
Gesamtdauer ab Vorinkub.	280min	190 / *115min	100 / *25min
Nachweis- grenze PSE (mol/l)	MAK F71D7	MAK F71D7	MAK F71D7
bei 90% Hemmung	$1,85 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-4}$ * $1,00 \times 10^{-3}$	$3,61 \times 10^{-6}$ * $7,94 \times 10^{-7}$
bei 50% Hemmung	$3,16 \times 10^{-6}$	$1,40 \times 10^{-5}$ * $6,31 \times 10^{-6}$	$2,51 \times 10^{-7}$ * $7,94 \times 10^{-8}$
bei 10% Hemmung	$6,81 \times 10^{-7}$	$3,10 \times 10^{-7}$ * $3,10 \times 10^{-7}$	$3,16 \times 10^{-8}$ * $3,16 \times 10^{-8}$
s (% Hemm.)	< 4,6	< 3,4 * < 4,1	< 5,3 * < 6,5

DISKUSSION

Durch ihre Anwendung in Industrie; Landwirtschaft und vor allem in der Veterinärmedizin gewinnen die Phosphorsäureester stetig an Bedeutung. Dabei kommt es häufig zu Intoxikationen bei Verarbeitung, Vertrieb und Anwendung dieser Substanzen, bzw. bei falscher Dosierung oder vorsätzlicher Verabreichung.

Zum Nachweis derartiger Verbindungen bei prophylaktischen, therapeutischen und forensischen Fragestellungen sind sichere Systeme gefordert, die leicht und schnell durchzuführen sind. Neben den aufwendigen gaschromatographischen Verfahren bieten sich auch immunologische Nachweissysteme an, wobei beim ELISA im Gegensatz zum RIA auf radioaktives Material verzichtet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde 1,2,2-Trimethyl-propyl-p-aminophenylphosphonat-hydrochlorid (PSE) als Modellsubstanz für Phosphorsäureester verwendet.

Da in immunologischen Verfahren der Nachweis über eine Antigen-Antikörper-Reaktion geführt wird, limitiert die Qualität der verwendeten Antikörper das jeweils entwickelte System. PSE sollte nun als Modellsubstanz für einen Phosphorsäureester im ELISA nachgewiesen werden.

Gute Ergebnisse beim Nachweis von PSE wurden bisher mit polyklonalen Antikörpern aus Hühner- und Kaninchenserum erzielt (Schmidt et al., 1988). Durch den Einsatz von spezifischen monoklonalen Antikörpern wird aber nun eine bessere Reproduzierbarkeit und Standardisierung erwartet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen PSE herzustellen und mit diesen Antikörpern schnell und einfach durchzuführende ELISA-Systeme zum spezifischen Nachweis von PSE zu entwickeln.

Vor der Immunisierung der BALB/c-Mäuse mit dem Antigen mußte dieses an ein Trägerprotein (HSA) gebunden werden, da PSE als Hapten kein Vollantigen darstellt und somit ungekoppelt keine Immunreaktion auslösen kann. Bei der Bindung von PSE an HSA durch Diazokopplung konnte mit 18 PSE-Molekülen/ HSA-Molekül ein Produkt erhalten werden, das den Ansprüchen eines guten Immunogens entspricht (Pinckard, 1978).

Zur Immunisierung von Balb/c- Mäusen wurden 100 ug Antigen pro Maus und Injektion verwendet (Claassen et al., 1986), Zur Verbesserung der Immunantwort wurde FCA bei der Erstimmunisierung verabreicht. Die erfolgte Boosterung nach 8 Wochen sollte die IgG-Ausbeute erhöhen. Durch eine intervallartige 2.Boosterung an 4 aufeinanderfolgenden Tagen und durch Verwendung von LPS als Mitogen am 1.Tag sollte zusätzlich die Stimulierung der Milzzellen optimiert werden (Andersson et al., 1978; Louis and Lambert, 1980; Stähli et al., 1980).

Die Zellfusion mit PEG am darauffolgenden Tag und die Kultivierung wurden mit den in der Literatur beschriebenen üblichen Methoden durchgeführt (Peters et al., 1985). Die beiden durchgeführten Zellfusionen erbrachten eine Fusionswahrscheinlichkeit von $2,67 \times 10^{-5}$ bzw. $3,84 \times 10^{-5}$ Hybridomzellen pro eingesetzte Myelomzelle. Bei der Berechnung wird von der Voraussetzung ausgegangen, daß nur eine Hybridomzelle pro Zellkulturplattenkavität ausgesät wurde. Sicherlich ist eine höhere Fusionswahrscheinlichkeit anzunehmen, da in mehr als 90 % aller Kavitäten nach der Fusion Zellwachstum zu beobachten war, wobei anzunehmen ist, daß durchschnittlich mehr als eine Hybridomzelle pro Kavität kultiviert wurde.

Ein geeigneter Screeningtest stellt den entscheidenden Schritt bei der Produktion monoklonaler Antikörper dar, da dabei die Zellen ausgesucht werden, die in der weiteren Arbeit Verwendung finden sollen. Zu diesem Zweck werden die Antikörper aufgrund ihrer Reaktivität mit ihren Zielantigenen getestet, um ihre Spezifität zu ermitteln.

Neben relativ unempfindlichen Geldiffusionsmethoden bietet sich auch hier der ELISA an. Um Kreuzreaktionen mit dem gekoppelten Protein zu vermeiden, werden üblicherweise andere Proteinträger verwendet (Hunter et al., 1982; Peters et al., 1982). Dennoch werden unspezifische Reaktionen beobachtet. Ein ähnliches Verhalten konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Nachdem bei der 1. Fusion 14,2 % der wachstumspositiven Zellkulturüberstände mit an Haemocyanin gekoppeltem PSE reagierten, konnte nur bei 2,6 % eine Reaktion mit direkt beschichtetem PSE beobachtet werden. 81,7 % der ursprünglich positiven Kulturen zeigten demnach eine Kreuzreaktion mit Haemocyanin bzw. mit der Diazobindungsstelle. Der Vorteil der Direktbeschichtung mit PSE liegt offensichtlich in der Vermeidung eines Proteinträgers. Darüber hinaus wurde im Gegensatz zu proteingekoppeltem PSE hierbei PSE über eine Schiff'sche Base an die ELISA-Platte gebunden. Bei der Erarbeitung derartiger Tests bietet sich somit die Direktbeschichtung mit dem Hapten schon zu Beginn des Screenings an, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden und somit den Arbeitsaufwand zu verringern.

Einen weiteren wichtigen Schritt bei der Herstellung monoklonaler Antikörper stellt die Klonierung positiver Zelllinien dar. Nur so kann gewährleistet werden, daß Antikörper gleicher Spezifität und Affinität erhalten werden.

Durch starkes Ausverdünnen der Zellkolonien (0,4 Zellen / Kavität) soll mit der sogenannten "limiting dilution"-Methode erreicht werden, daß neue Kolonien lediglich aus einer Zelle hervorgehen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ergebnis der Klonierung sowohl durch mikroskopische Kontrolle als auch durch statistische Wahrscheinlichkeitsberechnung (Poisson Wahrscheinlichkeit) überwacht.

Insgesamt wurden dabei 5 Hybridomzelllinien kloniert und bezüglich der Ig-Klassen und -Subklassen charakterisiert. Vier Klone gehörten der Subklasse IgG₁, ein Klon der Subklasse

IgG_{2a} an. In ähnlichen Untersuchungen berichten Gerhard et al. (1980) ebenfalls von einer Wahrscheinlichkeit für IgG₁ von 73 %.

Das Fehlen von monoklonalen IgM-Antikörpern ist wohl auf das lang dauernde Immunisierungsschema zurückzuführen. IgM-Antikörper werden nämlich nur zu Beginn der Antikörperantwort ausgebildet (Goding, 1983)

Die Gewinnung monoklonaler Antikörper ist sowohl über Kultur-Überstände als auch über Ascites möglich. Dabei ist die Ausbeute im Ascites um ein Vielfaches höher als über Zellkulturüberstände (Halk, 1986; Hoogenraad and Wraight, 1986).

In der vorliegenden Studie wurden deshalb die Antikörper fünf unterschiedlicher Klone über Ascites angereichert. Dabei konnten je nach Klon im Durchschnitt zwischen 2,9 ml (F71H10) und 9,7 ml Ascites (F71H9) pro Maus gewonnen werden. Teilweise wurden insgesamt bis zu 20 ml Ascites pro Maus erhalten. Bezüglich der Mengenausbeute zwischen den einzelnen Mäusen wurden dabei erhebliche Unterschiede deutlich.

Zur Standardisierung von immunologischem Nachweisverfahren erscheint es nützlich, die entsprechenden Antikörper möglichst in reiner Form zur Verfügung zu haben. Zur Isolierung hat sich die Affinitätschromatographie mit Hilfe von Protein A aus *Staphylococcus aureus* als geeignet erwiesen. Diese Art der Reinigung wird als sehr schonend für die Antikörper beschrieben, da IgG₁ schwach gebunden wird und unter milden Bedingungen (pH 6) eluiert werden kann (Ey et al., 1978).

Nach der Reinigung des Ascites konnten je nach Klon und Maus zwischen 3,8 mg (F71H9) und 11,2 mg Antikörper (F71H10) pro ml Ascites gewonnen werden. Diese Ausbeuten stimmen mit Halk (1986) überein, der von einem Antikörpergehalt von 1 mg bis 10 mg pro ml Ascites berichtet.

Klon F71H10 führte allerdings vor allem zur Ausbildung von soliden Tumoren, wobei die geringen Mengen Ascites im Vergleich zu den anderen Klonen erst sehr spät abgenommen werden konnten.

Mit Hilfe der isolierten monoklonalen Antikörper wurde im weiteren Verlauf versucht, einen empfindlichen immunologischen Nachweis für PSE zu entwickeln.

Derartige Tests beruhen im allgemeinen auf dem Prinzip der kompetitiven Verdrängung einer markierten Substanz durch die nachzuweisende Substanz in einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei besteht die Möglichkeit, je nach Wahl des Testsystems entweder das Antigen (direktes System) oder den entsprechenden Antikörper (indirektes System) enzymatisch zu markieren. Als Maß für die Konzentration der zu untersuchenden Substanz dient dabei die Abnahme der im ELISA erreichten Extinktion bei Zugabe der Probe im Vergleich zum ungehemmten System.

Dabei stellt die Affinität der verwendeten Antikörper einen wichtigen Parameter für deren Gebrauchswert dar. Speziell beim Einsatz im ELISA wird eine hohe Affinität gefordert, um eine möglichst niedrige Nachweisgrenze zu erreichen, da nur hochaffine Antikörper bei sehr geringen Antigenkonzentrationen reagieren und somit das Testsystem modulieren können. Allgemein wird als Maß für die Affinität die Assoziationskonstante angesehen, die in aufwendigen Untersuchungen, wie z.B. der Gleichgewichtsdialyse ermittelt werden kann (Eisen and Siskind, 1964; Fiebig und Kleist, 1984).

In der vorliegenden Arbeit war es wichtig, den Antikörper mit der höchsten Affinität zum Hapten zu ermitteln. Die Antikörperaffinitäten zum Hapten können nach Nieto et al. (1984) in einfacher Weise durch die Hemmbarkeit der Antikörper mit freiem Hapten abgeschätzt werden. Als Maß für die Affinität dient dabei die Haptenkonzentration, die notwendig ist, um 50 % der Antikörperaktivität zu hemmen.

Wie aus den vorliegenden Ergebnissen hervorgeht, haben sich dabei die Antikörper F71D7 und F71H10 als diejenigen mit der höchsten Affinität zu freiem PSE herausgestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde deshalb hauptsächlich der Antikörper F71D7 verwendet, der sich im Ascites weitaus besser produzieren ließ.

Bei diesen Tests fiel interessanterweise auf, daß sich die Affinität der Antikörper zur Plattenbeschichtung mit PSE-BSA (Messung der halbmaximalen Extinktion einer ungehemmten Probe) in anderer Weise verhielt. Dies ist wohl auf die hier veränderten Testbedingungen zurückzuführen. Nach Day (1972) hängt nämlich die Affinität u.a. vom Testsystem ab, mit welchem die wirksame Bindungsstärke zwischen Antigen und Antikörper ermittelt wird. Darüber hinaus ist bekannt (Engvall and Perlmann, 1972), daß sich die Affinität zum Hapten ändert, sobald dieses an ein Trägerprotein gekoppelt ist.

Als weitere Voraussetzung für die Eignung eines Antikörpers gilt neben einer hohen Affinität die strenge Spezifität zum Antigen. Nur so können falsch positive Resultate ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung der Spezifität der fünf isolierten monoklonalen Antikörper wurde ihre Kreuzreaktion mit den zur Zeit häufig als Insektizide eingesetzten Phosphorsäureestern Dichlorphos, Methyl-Paraoxon, Malathion, Methyl-Parathion und Trichlorphon getestet.

Methyl-Paraoxon und Methyl-Parathion besitzen analog zum PSE einen Benzolring, während Dichlorphos, Methyl-Paraoxon und Trichlorphon ein Sauerstoffatom am Phosphoratom aufweisen. Methyl-Gruppen sind bei allen getesteten Phosphorsäureestern in unterschiedlicher Anzahl vorhanden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die isolierten Antikörper streng PSE-spezifisch sind, da sie mit den anderen Phosphorsäureestern nicht reagierten.

Lediglich der Antikörper F71H9 wurde durch sehr hohe Mala-

Antikörperkonzentrationen (10^{-3} mol/l) geringgradig gehemmt. Dieser Antikörper wurde deshalb in den weiteren Versuchen nicht mehr verwendet, da er offensichtlich gemeinsame Determinanten von PSE und anderen Verbindungen erkennt.

Mit Hilfe der somit definierten monoklonalen Antikörper wurden drei verschiedene ELISA-Systeme zum immunologischen Nachweis von PSE entwickelt. Die Hemmkurven zeigen dabei durchwegs einen sigmoiden Verlauf. Dabei ist nach Clark (1986) zwischen drei Kurvenregionen zu unterscheiden. Im Anfangsabschnitt der Kurven bei maximaler Hemmung zeigt sich ein Plateau, das unter anderem durch die Absättigung der Bindungsstellen, durch Substratlimitierung oder intramolekulare Verdrängung bedingt ist. In diesem Bereich ist nur eine qualitative Aussage in Bezug auf das Vorhandensein der nachweisenden Substanz möglich. Im weiteren Verlauf der Titrationskurve kann der lineare Bereich zur Bestimmung der Quantität herangezogen werden. Die dritte Region mit geringer Hemmkonzentration wird lediglich als proportional bezeichnet und kann bedingt zur Quantitätsbestimmung verwendet werden.

Die hier entwickelten ELISA-Systeme unterscheiden sich untereinander in der Art der Hemmung bzw. in der Methode der Markierung.

Das erste System, der CIEIA (competitive inhibition enzyme immunoassay), wird häufig zum Nachweis von Haptenen verwendet (Hunter and Lenz, 1981; Peters et al., 1982; Liu et al., 1985).

Er beruht auf der kompetitiven Verdrängung haptenspezifischer Antikörper von ihrer Bindung zur haptenbeschichteten ELISA-Platte durch freies Hapten in der Probe. Die Markierung des gebundenen Antikörpers erfolgt dabei in einem weiteren Inkubationsschritt durch Zugabe enzymmarkierter spezies- und subtypenspezifischer Antikörper. Die Hemmkurven, die in der

vorliegenden Arbeit mit den unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern erhalten wurden, entsprechen sich in ihrem sigmoiden Verlauf (Abb.11-13) bei unterschiedlichen Nachweisgrenzen von $1,08 \times 10^{-4}$ mol/l PSE ($IC_{10}/F81G2$) bis $5,41 \times 10^{-7}$ mol/l PSE ($IC_{10}/F71H10$). Die prozentuale Standardabweichung war stets $< 4,6 \%$. Der lineare Bereich der Hemmkurven beschränkte sich auf vier $\log_2$ -Titrationsstufen. Eine Hemmung der Antikörperaktivität bei der Verwendung von Kaninchen-anti-PSE-Antikörper bzw. Huhn-anti-PSE-Antikörper erbrachte dagegen einen linearen Bereich von zwei bis drei $\log_{10}$ -Titrationsstufen (Kühlmann, 1987). Diese Tatsache ist durch die Einheitlichkeit und darausfolgend auch identische Affinität der monoklonalen Antikörper im Gegensatz zu polyklonalen Seren zu erklären (Peters et al., 1985). Die Nachweisgrenze für PSE lag unter Verwendung des hochaffinen Antikörpers F71D7 bei $6,81 \times 10^{-7}$ mol/l PSE (10 %ige Hemmung der Antikörperaktivität). Der Nachteil dieses Systems liegt allerdings in seiner relativ langen Dauer von 280 Minuten.

Im indirekten kompetitiven ELISA konnte die Testdauer erheblich reduziert werden. Dieser Test beruht auf demselben Prinzip wie der CIEIA. Die Markierung des gebundenen Antikörpers beruht aber auf der vorausgegangenen Kopplung des Antikörpers mit Meerrettichperoxidase. Es kann deshalb in diesem System auf den Inkubationsschritt mit dem zweiten enzymgekoppelten subtypenspezifischen Antikörper verzichtet werden. Wie die Ergebnisse zeigen, liegt die Nachweisgrenze für PSE unter Verwendung von F71D7 im gleichen Bereich wie beim CIEIA. Durch Verkürzung des Inkubationsschrittes der Proben auf der ELISA-Platte konnte die Testdauer um weitere 75 Minuten verkürzt werden, wobei sich die unterste Nachweisgrenze nur unwesentlich änderte. Lediglich die Standardabweichung erhöhte sich bei verkürzter Inkubationszeit um $0,7 \%$. Ein ähnliches Verhalten wurde von Van Emon (1987) beim Nachweis von Paraquat beschrieben.

Der dritte ELISA (direkter kompetitiver ELISA) unterscheidet sich grundlegend von den vorherigen Systemen. Er beruht auf der Konkurrenz von Proben-Hapten und markierten Hapten um die Bindungsstelle zum plattengebundenen Antikörper.

Zur Entwicklung dieses Systems wurde PSE an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Aus sterischen Gründen wurde zunächst ein Tripeptid Gly-His-Lys als Spacer an PSE gebunden. Die Ausbeute der Kopplungsprodukte war erwartungsgemäß von der Konzentration der jeweiligen Kopplungspartner abhängig. In einem weiteren Schritt wurde das Produkt PSE-Spacer an Peroxidase gebunden. Wie die Ergebnisse zeigen, nahm die Reaktivität des Kopplungsproduktes (PSE-Peroxidase) mit der Plattenbeschichtung (F71D7) mit steigender PSE-Spacer-Konzentration im Kopplungsansatz zu. Bezüglich des Hemmkurvenverlaufs und daraus folgend der Nachweisgrenzen brachten die verschiedenen Kopplungsansätze identische Ergebnisse.

Im Vergleich zu den indirekten Systemen konnte im direkten ELISA die Nachweisgrenze für PSE noch deutlich vermindert werden, wobei eine Verkürzung der Antikörper-Antigen-Inkubationszeit von 90 auf 15 Minuten zum gleichen IC_{10} -Wert $3,16 \times 10^{-8}$ mol/l PSE führte. Die prozentuale Standardabweichung erhöhte sich dabei von 5,3 % auf 6,5 %.

Nach Clark et al. (1986) und Halk (1986) ist im ELISA eine Nachweisgrenze im Nanogrammbereich (1 bis 10 ng) zu erwarten, wobei allgemein monoklonale Antikörper im Vergleich zu polyclonalen Antikörpern eine geringere Affinität zeigen (Ehrlich and Moyle, 1986). Hunter et al. (1982) konnte vergleichsweise mit Hilfe monoklonaler Antikörper in einem indirekten ELISA-System $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l Soman nachweisen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß PSE in einer Konzentration von $3,16 \times 10^{-8}$ mol/l (entspricht 9,5 ng/ml) im direkten kompetitiven ELISA in Form eines Schnelltests in 25 Minuten nachgewiesen werden kann.

Der große Vorteil dieses entwickelten Nachweissystems ist in der hohen Spezifität mit einem hohen Grad an Reproduzierbarkeit zu sehen. Bei der Betrachtung der LD_{50} -Werte vergleichbarer Phosphorsäureester wie zum Beispiel Methyl-Parathion (LD_{50} : 14 mg/ kg Ratte per os) oder Methyl-Paraaxon (LD_{50} : 2,5 mg/ kg Ratte per os) (Wegner, 1970) kann die Nachweisgrenze für PSE im Vergleich zu biologisch relevanten Dosen als ausreichend empfindlich eingestuft werden. Beispielsweise wäre ein Nachweis von Umweltkontaminationen möglich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper systematisch ein schnell durchzuführendes, spezifisches und hochempfindliches ELISA-System zum Nachweis eines Phosphorsäureesters entwickelt. Als Modellantigen diente 1,1,2-Trimethyl-propyl-p-aminophenyl-phosphonat (1993).

Für Gewinnung antikörperproduzierender Hybridomzellen wurden Balb/c-Mäuse mit an humanes Serumalbumin gekoppeltem von immunisiert. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden mit syngenen Myelomzellen der "non producer"-Linie AN3-0/1 mit Hilfe von Polyethylenglycol fusioniert. Die Fusionsrate betrug dabei mindestens $1,37 \times 10^{-5}$ bzw. $3,64 \times 10^{-5}$ Hybridomzellen pro eingesetzte Myelomzelle.

Übliche Screeningverfahren wurden durch Direkttestung der ELISA-Platten mit Hapten modifiziert, wodurch unerwünschte Kreuzreaktionen vermieden werden konnten.

5 der 15 positiven Zelllinien wurden durch "limiting dilution" kloniert und weiter vermehrt.

Von den gewonnenen monoklonalen Antikörpern wurde die jeweilige Immunglobulinklasse bzw. -subklasse bestimmt. Vier Antikörper erwiesen sich als IgG₁, einer als IgG_{2a}.

Die weitere Anreicherung der Antikörper im Ascites und Isolierung über Protein A-Sepharose führte zu einer Ausbeute von 3,8 bis 11,2 mg affinitätschromatographisch reinem Antikörper pro ml Ascites.

Durch Messung der 50 %igen Hemmkonzentration (IC_{50} -Werte) von freiem PSE wurde die Affinität der verschiedenen monoklonalen Antikörper im CIEIA abgeschätzt. Diese lagen dabei zwischen $2,51 \times 10^{-6}$ mol/l PSE und $4,30 \times 10^{-4}$ mol/l PSE.

Zur Überprüfung der Spezifität der monoklonalen Antikörper wurde die Reaktivität mit strukturell verwandten Phosphorsäureestern herangezogen. Dabei konnte praktisch keine Kreuzreaktion festgestellt werden.

Mit Hilfe des hoch affinen und hoch spezifischen Antikörpers F71D7 wurden drei unterschiedliche ELISA-Systeme zum Nachweis von PSE entwickelt.

Beim "competitive inhibition enzyme immunoassay" (CIEIA), bei dem die Antikörperreaktion mit Hilfe eines zweiten speziesspezifischen enzymgebundenen Antikörpers sichtbar gemacht wird, wurde eine Nachweisgrenze für PSE von $6,81 \times 10^{-7}$ mol/l bei einer Gesamtdauer des Testes von 280 Minuten erreicht.

Nach der Kopplung des Antikörpers an Meerrettichperoxidase konnte im indirekten kompetitiven ELISA die Gesamtdauer auf 190 Minuten bei einer Nachweisgrenze von $3,10 \times 10^{-7}$ mol/l PSE reduziert werden.

Für die Entwicklung des direkten kompetitiven ELISA wurde PSE unter Einfügung eines Spacers an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Dabei wurde die Gesamtdauer auf 25 Minuten verkürzt und die Nachweisgrenze auf $3,16 \times 10^{-8}$ mol/l PSE (entspricht 9,5 ng/ml) weiter herabgesetzt. Dieser ELISA eignet sich daher gut als Schnelltest mit ausreichender Nachweisgrenze für PSE.

6. SUMMARY

Development of different highly-specific ELISA-systems against a phosphate ester using hapten-specific monoclonal antibodies.

The objective of this paper has been the description of a specific and highly sensitive ELISA-system in order to assay a phosphate ester. 1,2,2-tri-methyl-propyl-p-aminophenyl-phosphonat (PSE) served as model-ester.

In order to obtain antibody-producing hybridomas balb/c-mice were immunized with PSE linked onto HSA. The immunized mice's spleen cells were fused with syngenic plasmacytomas of the non-producer-line X63Ag8.653 with the aid of polyethyleneglycol. The rate of fusion was at least 2.67×10^{-5} or 3.84×10^{-5} hybridomas per myeloma cell respectively.

To eliminate undesirable cross-reaction common screening procedures were modified by directly coating the ELISA plates with hapten.

5 out of 15 positive cell-lines were cloned by limiting dilution and expended further.

The respective immunoglobulin-class and sub-class of the obtained monoclonal antibodies were determined. Four of which turned out to be IgG₁, one was identified as IgG_{2a}.

Further enrichment of antibodies in ascites and their isolation by Protein-A Sepharose led to a yield between 3.8 and 11.2 mg of pure antibodies.

The affinity of various monoclonal antibodies was estimated in CIEIA by measuring the IC_{50} -rates of free PSE. The rates were found to lie between 2.51×10^{-6} mol/l and 4.30×10^{-4} mol/l PSE.

The monoclonal antibodies' reactivity with structurally related phosphate ester was used to check their specificity. Cross reaction turned out to be negative.

F71D7, an antibody of high affinity and high specificity, was used to develop three distinct ELISA systems to assay PSE.

In competitive inhibition enzyme immunoassay (CIEIA) antibody reaction was made visible with help of a second species-specific enzyme-bound antibody.

Threshold for detectable PSE concentration was 6.81×10^{-7} mol/l. Test duration was 280 minutes.

After linking the antibody to horseradish-peroxidase total duration could be reduced to 190 minutes. The detection level for PSE was 3.10×10^{-7} mol/l.

In order to develop a direct competitive ELISA PSE was linked to HRPO by adding a spacer. This helped to reduce total duration to 25 minutes. The detection level was further reduced to 3.16×10^{-8} mol/l PSE (corresponding to 9.5 ng/ml). The above results recommend this potential ELISA as a quick-test with sufficient detection-level for PSE.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSSON, J., A. COUTINHO, and I. MELCHERS, 1978

Stimulation of murine B lymphocytes to IgG synthesis and secretion by mitogens lipopolysaccharide and lipoprotein and its inhibition by anti-immunoglobulin antibodies.
Eur. J. Immunol. 8, 336-343

ASHWOOD- SMITH, M.I., 1961

Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethylsulfoxide.
Nature 190, 1204-1205

BENSHOP, H.P., C.A.G. KONINGS, and L.P.A. DE JONG, 1981

Gas chromatographic separation and identification of four stereoisomers of 1,2,2- trimethylpropyl-methylphosphonofluoridate (soman). Stereospecificity of in vitro "detoxification" reactions.
J. Am. Chem. Soc. 103, 4260-4262

BOSCH, A.M.G., H. VAN HELL, J. BRANDS, and A.H.W.M. SCHUURS, 1978

Specificity, sensitivity and reproducibility of enzyme-immunoassay.
In: Enzyme- linked immunoassay of hormones and drugs edited by S.B. Pol. pp. 175-187
Walter de Gruyter, Berlin and New York

BRADFORD, M.M., 1976

A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254

BRODEUR, B., P. TSANG, and Y. LAROSE, 1984

Parameters affecting ascites tumor formation in mice and monoclonal production.

J. Immunol. Methods 71, 265-272

CAMPBELL, A.M., 1984

Monoclonal antibody technology. Production and characterisation of rodent and human hybridomas.

Bordon, R.H., P.H. van Knippenberg (Hrsg.)

Elsevier Science Publishing Company, Inc., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford

CHALON, M.P., R.W. MILNE, and R.W. VAERMAN, 1979

Interaction between mouse immunoglobulin and staphylococcal protein A.

Scand. J. Immunol. 9, 359-364

CLAASSEN, E., N. KORS, and N. VAN ROOIJEN, 1986

Influence of carriers on the development and localization of anti-trinitrophenyl antibody-forming cells in the murine spleen.

Eur. J. Immunol. 16, 271-276

CLARK, M.F., R.M. LISTER, and M. BAR- JOSEPH, 1986

Elisa techniques.

Methods Enzymol. 118, 742-766

COLLER, H.A., and B.S. COLLIER, 1986

Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality.

Methods Enzymol. 121, 412-417

DAY, E.D., 1972

Advanced Immunochimistry.

Williams and Wilkins, Baltimore, USA

D'AGOSTINO, P.A., and L.B. PROVOST, 1986

Capillary column ammonia chemical ionisation mass spectrometry of organophosphorus chemical warfare agents and simulants.

Biochem. Environ. Mass Spectrom. 13, 231-236

DAUNDERER, M., D. KIRSCH, S. SCHÄFER, L. SKINIOZ und N. WEYER, 1980

Mechanismus der Toxizität und Abschätzung des Toxizitätsrisikos.

Deusch. Arztebl. 50, 2975-2977

DAVIES, D.R., 1983

Neurotoxicity of organophosphorous compounds

In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie

Ergänzungswerk XV

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 860-861

DE BLAS, A.L., M.V. RATNAPARKHI, and J.E. MOSIMANN, 1983

Estimation of the number of monoclonal hybridomas in a cell-fusion experiment.

Methods Enzymol. 92, 36-39

EBERLICH, P.H., and W.R. MOLYE, 1986

Ultraseensitive cooperative immunoassays with mixed monoclonal antibodies.

Methods Enzymol. 121, 695-701

EISEN, H.N., and G.W. SISKIND, 1964

Variation in affinities of antibodies during the immune response.

Biochemistry 3, 996-1008

ENGVAL, E., and P. PERLMANN, 1972

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.

III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.

J. Immunol. 109, 129-135

EY, P.L., S.J. PROWSE, and C.R. JENKIN, 1978

Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein-A-Sepharose.

Immunochem. 15, 429-436

EYER, P., W. HELL, A. KAWAN, and H. KLEHR, 1986

Studies on the decomposition of the oxime HI 6 in aqueous solution.

Arch. Toxicol. 59, 266-271

FENTON, J.W., and S.J. SINGER, 1971

Affinity labeling of antibodies to the p-azophenyltrimethylammoniumhaptens, and a comparison of affinity-labeled antibodies to two different specificities.

Biochemistry 10, 1429-1437

FIEBIG, H., und H. KLEIST, 1984

Affinitätsabschätzung von Antikörpern.

In: Immunologische Arbeitsmethoden

(Ed: H. FRIEMEL)

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 56-69

FORSQREN, A., and J. SJOQUIST, 1966

Protein A from *S. aureus*.

I. Pseudo- immune reaction with human -globulin.

J. Immunol. 97, 822-827

FORTH, W., D. HENSCHLER, und W. RUMMEL, 1983

Organische Phosphorsäureester

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und
Toxikologie, (Ed: W. FORTH)

B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich,
4.Auflage, pp. 674-679

GALFRE, G., S.C. HOWE, and C. MILSTEIN, 1977

Antibodies major histocompatibility antigens produced by
hybrid cell lines.

Nature 266, 550-552

GALFRE, G., and C. MILSTEIN, 1981

Preparation of monoclonal antibodies. Strategies and
procedures.

Methods Enzymol. 73, 3-46

GERHARD, W., J. YEWDELL, M.E. FRANKEL, A.D. LOPES, and L.
STAUDT, 1980

Monoclonal antibodies against influenza virus.

Kennett, R.H., T.J. Mc Kean, K.B. Bechtol (eds.)

Monoclonal Antibodies, Plenum Press

GODING, J.W., 1983

Immunoglobulin class switches.

In: Monoclonal antibodies: Principles and practice.

(Ed: J.W. GODING)

Academic Press Inc., London, pp. 27-28

GROB, B., 1963

Anticholinesterase intoxication in man and its treatment.

In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Ergänzungswerk XV,

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp.990-1027

HALK, E.L., 1986

Serotyping plant viruses with monoclonal antibodies
Methods Enzymol. 118, 766-775

HAUSER, W., D. KIRSCH, and N. WEGER, 1981

Therapeutic effects of new oximes, benactyzine and atropine in soman poisoning: Part II. Effect of HGG 12, HGG 42, and obidoxime in poisoning with various anticholinesterase agents in beagle dogs.

Fundamental and Applied Toxicology 1, 164-168

HOOGENRAAD, N.I., and C.I. WRIGHT, 1986

The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production.

Methods Enzymol. 121, 375-381

HUNTER, K.W., D.E. LENZ, A.A. BRIMFIELD, and I.A. NAYLOR, 1982

Quantification of the organophosphorus nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibody.

FEBS Lett. 149, 147-151

HUNTER, K.W., and D.E. LENT, 1981

Detection and quantification of the organophosphate insecticide paraoxon by competitive inhibition enzyme immunoassay.

Life Sci. 30, 355-361

JOLLY, D.W., 1957

The toxicity of organic phosphorous insecticides.

Vet. Rec. 69, 769-800

KEARNEY, J.F., A. RADGRUCH, B. LIESEGANG, and K. RAJEWSKY, 1979

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybridoma cell lines.

J. Immunol. 123, 1548-1550

KEENAN, A.W., I.C. BARBERT, and S.M. LARSON, 1985

Monoclonal antibodies in nuclear medicine.

J. Nucl. Med. 26, 531-537

KÖHLER, G., and C. MILSTEIN, 1975

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256, 495-497

KOSILE, G.B., 1957

Histochemical demonstration of reactivation of acetylcholinesterase in vivo.

Science 125, 1195-1196

KRAFT, W., 1984

Keintierkrankheiten: Bd. 1, Innere Medizin.

Verlag Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart

- KRONVALL, G., H.M. GREY, and R.C.J. WILLIAMS, 1970
Protein A reactivity with mouse immunoglobulins.
J. Immunol. 105, 1116-1123
- KÜHLMANN, R., 1987
Haptenspezifische Antikörper gegen einen Phosphorsäure-
ester.
Vet.- med. Diss., Universität München
- LAEMMLI, U.K., 1970
Cleavage of structural proteins during the assembly of
the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685
- LEUZINGER, S., und A. PASI, 1970
Die Vergiftung mit phosphororganischen Insektiziden bei
Haus- und Nutztieren.
Schweiz. Arch. Tierheilkd. 112, 269-279
- LEVY, R., J. DILLEY, and L.A. LAMPSON, 1978
Human normal and leukemia cell surface antigens. Mouse
monoclonal antibodies as probes.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 164-169
- LIU, M.T., B.P. RAM, L.P. HART, and J.J. PESTKA, 1985
Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the myco-
toxin zearalenone.
Appl. Environ. Microbiol. 50, 332-336
- LOUIS, J.A., and P.-H. LAMBERT, 1980
Lipopolysaccharides: From immunostimulation to auto-
immunity.
In: Immunostimulation (Eds.: L. CHEDID, P.A. MIESCHER
and H.J. MÜLLER-EBERHARD
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 59-64

MATSUMURA, F., 1985

Toxicology of insecticides.

Second Edition

Plenum Press, New York and London

MORRIS, D., P. ELLIS, R. CARRICO, F. YEAGER, H. SCHROEDER, J. ALBERELLA, and R. BOGUSLASKI, 1981

Flavin adenine dinucleotide as a label in homogeneous colorimetric immunoassays.

Anal. Chem. 53, 658-665

NIETO, A., A. GAYA, M. JANSÁ, C. MORENO, and J. VIVES, 1984

Direct measurement of antibody affinity distribution by hapten-inhibition enzyme immunoassay.

Mol. Immunol. 21, 537-543

OUCHTERLONY, Ö., 1962

Diffusions-in-gel-methods for immunological analysis II. Progr. Allergy 6, 30-154

PETERS, H., M.P. DIERICH, and K. DOSE, 1982

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1437-1441

PETERS, I.H., H. BAUMGARTEN und M. SCHULZE, 1985

Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung

Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

PHARMACIA, 1986

Specific monoclonal antibody purification techniques.

Separation news, 13-5

PINCKARD, R.N., 1978

Equilibration dialysis and preparation of hapten conjugates.

In: Handbook of experimental immunology (Ed: D.M. WEIR)

Blackwell Scientific Publications,

Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, pp. 17.1-17.23

RAPPAPORT, F., J. FISCHL, and N. PINTO, 1959

An improved method for the estimation of cholinesterase activity in serum.

Clin. Chim. Acta 4, 227-230

RUBENSTEIN, K.E., R.S. SCHNEIDER, and E.F. ULLMANN, 1972

Homogeneous enzyme immunoassay. A new immunochemical technique.

Biochim. biophys. Res. Commun. 47, 846- 851

SASS, S., T.L. FISHER, R.J. STEGER, and G.A. PARKER, 1982

Gas chromatographic methods for the analysis of trace quantities of isopropyl methylphosphonofluoridate and associated compounds, in situ and in decontamination effluent.

J. Chromatogr. 238, 445-456

SCHMIDT, P., R. KÜHLMANN, and U. LÖSCH, 1988

Detection of organophosphorus compounds.

Biosciences in press

SEPPÄLÄ, I., H. SARVAS, F. PETERFY, and O. MÄKELÄ, 1981

The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using protein A- sepharose.

Scand. J. Immunol. 14, 335-342

SILVESTRI, G.R., 1977

New techniques to measure blood cholinesterase activity
in domesticated animals.

Am. J. Vet. Res. 38, 659-662

STÄHLI, C., T. STAEHELIN, V. MIGGIANO, J. SCHMIDT, and P.
HÄRING, 1980

High frequencies of antigenspecific hybridomas:
Dependence on immunisation parameters and prediction by
spleen cell analysis.

J. Immunol. Methods 32, 297-304

SULLIVAN, M.J., J.W. BRIDGES, and V. MARKS, 1979

Enzyme immunoassay: a review.

Ann. Clin. Biochem. 16, 221-240

SUTER, M., 1982

A modified ELISA technique for anti-hapten antibodies.

J. Immunol. Methods 53, 103-108

SUTTNAR, J., Z. HRHAL, and Z. VODRAZKA, 1977

Affinity chromatography of serum haemopexin

J. Chromatogr. 131, 453-457

TIJJSSEN, P., and E. KURSTAK, 1984

Highly efficient and simple methods for the preparation
of peroxidase and active peroxidase antibody conjugates
for enzyme immunoassays.

Anal. Biochem. 136, 451-457

TIJJSSEN, P., D.M. SU, and E. KURSTAK, 1982

Rapid and sensitive heterologous enzyme immunoassays for
densonucleosis virus (Parvoviridae).

Arch. Virolog. 74, 277-291

- VAN EMON, J., J. SEIBER, and B. HAMMOCK, 1987
Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine paraquat residues in milk, beef, and potatoes.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39, 490-497
- VAN HEYNINGEN, V., 1986
A simple method for ranking the affinities of monoclonal antibodies.
Methods Enzymol. 121, 472-481
- VAN WEEMEN, B.K., and A.H.W.M. SCHUURS, 1971
Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.
FEBS Lett. 15, 232-237
- WEGLER, R., (Ed.), 1970
Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel, Band 1.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York,
pp. 377-379
- WELLS, D.E., and W.F. BIBB, 1986
A method for freezing hybridoma clones in 96-well microcultur plates.
Methods Enzymol. 121, 417-422
- WILLEEMS, J.L., M. NICAISE, and H.C. DE BISSCHOP, 1984
Dayled neuropathy by the organophosphorus nerve agents soman and tabun.
Arch. Toxicol. 55, 76-77
- WORLD HEALTH ORGANISATION, 1986
Organophosphorus insecticides: A general introduction.
Environmental Health Criteria 63, Geneva, pp. 31-33

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Schmid möchte ich mich für die fachliche Beratung in toxikologischen Fragen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Schmidt für die vorbildliche Einarbeitung und Betreuung sowie seine stete Bereitschaft zur Diskussion.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Labors, insbesondere Herrn Dr. R. Kühlmann, für die stete Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

03.08.1959	Geboren in München als Sohn von Helmut Erhard und Ingeborg Glauer-Erhard, geborene Tröger
1965-1969	Grundschule in München
1969-1971	Gymnasium des kath. Familienwerkes, Pullach
1971-1979	Asam- Gymnasium, München
27.06.1979	Allgemeine Hochschulreife
01.07.1979- 30.09.1980	Grundwehrdienst, Calw
1980-1986	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
23.07.1986	Staatsexamen
30.09.1986	Approbation
seit August 1986	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
seit Dezember 1986	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

